

Bedeutung von Plakophilin 2 für die Bildung von Zellverbindungen zwischen Herzmuskelzellen und die Morphogenese des Herzens

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat)
im Promotionsfach Biologie
eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

angefertigt von Dipl. Biol. Katja Susann Großmann
geboren am 02.05.1978 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marschkies

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:

1. Prof. W. Birchmeier
2. Prof. H. Saumweber
3. Prof. L. Thierfelder

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2005

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Walter Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Einleitung	6
Die Armadillo-Familie der Adhäsions- und Signalmoleküle	6
Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen sind zwei Arten verwandter Zellverbindungen	7
Der molekulare Aufbau der Desmosomen	8
Die Plakophiline sind Bestandteile von Desmosomen	14
Das Zusammenspiel von Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen	15
In den Glanzstreifen des Herzens existieren verschiedene Arten von Zellverbindungen	16
Zellverbindungen spielen eine Rolle in der frühen Embryonalentwicklung	18
Desmosomale Proteine in der späteren Embryonalentwicklung und bei Krankheiten	19
Ziel dieser Arbeit	21
Ergebnisse	23
Erzeugung Plakophilin 2-defizienter Mäuse	23
Herzdefekte in Plakophilin 2 ^{-/-} -Embryonen	26
Veränderungen in der Zusammensetzung und Architektur der Zellverbindungen in den Glanzstreifen der Plakophilin 2 ^{-/-} -Embryonen	29
Biochemische Unterschiede in Zellverbindungen embryonaler Herzen	36
Reduzierte Proteinstabilität der desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2a/b in Pkp2 ^{-/-} -Herzen	38
Mutationen in Plakophilin 2 sind häufig in Arrhythmogener-Rechts-Ventrikulärer-Kardiomyopathie	39
Diskussion	44
Plakophilin 2 ist essentiell für die Organisation kardialer Zellverbindungen	44
Veränderungen desmosomaler Komplexe in den Glanzstreifen des Herzens	44
Der Verlust von Plakophilin 2 in Epithelien kann kompensiert werden	46
Die funktionellen Unterschiede von Plakophilin 2 und Plakoglobin	47
Plakophilin 2-Mutationen in ARVC-Patienten	48
Arrhythmogene-Rechts-Ventrikuläre Kardiomyopathie	48
Haploinsuffizienz oder dominant-negative Mechanismen der Plakophilin 2-	

Mutationen	50
Mögliche heterozygote Maus-Modelle zur Aufklärung eines haploinsuffizienten Plakophilin 2-Krankheitsmechanismus	52
Materialien und Methoden	55
Molekularbiologische Standardmethoden, Chemikalien, Kits und Geräte	55
Bakterienstämme und verwendete Plasmide	55
Konstruktion des Rekombinationsvektors, Kultivierung, Elektroporation und Selektion von Zellen	56
Genotypisierungen, Southern-Blot und Northern-Blot	58
Embryoschnitte und -färbungen	59
Immunhistochemie	60
Immunfluoreszenzmikroskopie	61
Elektronen- und Immuielektronenmikroskopie	61
Detergenzextraktion, Gelelektrophorese und Western-Blot	62
Semiquantitative Real-Time-PCR	64
Sequenzanalyse der ARVC-Patienten	65
Abkürzungen	66
Literaturverzeichnis	68
Erklärung	84
Publikationsliste	85

Zusammenfassung

Plakophiline sind Proteine der Armadillo-Familie, die eine Funktion während der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus aufweisen. Mutationen in Genen, die für diese Proteine kodieren, führen häufig zu Krankheiten. In dieser Arbeit wird der Phänotyp von Plakophilin 2-defizienten Mausembryonen untersucht, welche Probleme in der Morphogenese des Herzens und dessen Stabilität aufzeigen. Feine Risse in der Herzwand in den Tagen 10.5-11 der Embryogenese führen zu Blutfluss in die Perikardialhöhle und resultieren in embryonalem Tod. In Abwesenheit von Plakophilin 2 löst sich das Zytoskelett-bindende Protein Desmoplakin aus den Zellverbindungen der Kardiomyozyten und bildet Aggregate im Zytoplasma. Im Gegensatz dazu bleiben Zellverbindungen der Epithelien unverändert. Die molekulare Analyse des betroffenen Gewebes lässt eine essentielle Rolle für Plakophilin 2 in der Organisation der Zellverbindungen im Herz ableiten. Besonderen Wert bekamen diese Untersuchungen, als es gelang, die erarbeiteten Zusammenhänge mit einer Krankheit beim Menschen zu koppeln. Beachtlicherweise wurden bei mehr als 25% der an Arrhythmogener-Rechts-Ventikulärer-Kardiomyopathie (ARVC) erkrankten Menschen, Mutationen im Gen für Plakophilin 2 gefunden.

Einleitung

Für die Entstehung und Aufrechterhaltung mehrzelliger Organismen ist die Organisation von Zellen in strukturell und funktionell unterschiedliche Zellverbände sowie deren Stabilität von essentieller Bedeutung. Es ist somit von grundlegender Voraussetzung, dass Zellen fähig sind, zwischen gleichartigen und andersartigen Zelltypen zu unterscheiden und sich in einem Zellverband zu verankern. Bei diesem Zellverankerungsprozess spielen Zelladhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle. Solche Zelladhäsionsmoleküle bilden filament-verankernde Zellverbindungen, welche die mechanische Stabilität eines Zellverbandes beziehungsweise eines Gewebes entscheidend bestimmen.

Die Armadillo-Familie der Adhäsions- und Signalmoleküle

Plakophilin 2 gehört zur Familie der Armadillo-Proteine¹. Die Armadillo-Familie der Adhäsionsmoleküle charakterisiert sich durch aneinandergereihte Armadillo (Arm) -Motive, welche eine Länge von ungefähr 42 Aminosäuren aufweisen. Sie wurden erstmals im *Drosophila melanogaster*-Segmentpolaritätsgen *armadillo* nachgewiesen. Ähnliche Motive wurden später in dem Säugerhomolog β -Catenin identifiziert²⁻⁶. Zur Familie der Armadillo-Proteine gehören neben den Plakophilinen und β -Catenin weitere Proteine wie Plakoglobin und die p120catenine^{7,8} (Abb. 1). Auch andere Moleküle enthalten Armadillo-Motive, die hier beschriebene Familie zeichnet sich jedoch durch die duale Lokalisierung ihrer Mitglieder aus. Neben ihrer Anwesenheit an der Zellmembran und der damit verbundenen Funktion als adhäsive und stabilisierende Moleküle, wurden diese Armadillo-Proteine auch in ihrer Lokalisierung im Zellkern beschrieben^{1,9-12}. Für einen Großteil dieser Proteine ist die Funktion im Zellkern, beispielsweise als Signalmolekül, weitgehend unklar. Als gut etabliertes Beispiel gilt jedoch β -Catenin, obwohl besonders in letzter Zeit auch viel über die Funktion von Plakoglobin im Zellkern bekannt wurde¹³⁻²¹. β -Catenin hat eine duale Funktion, zum einen als Adhäsionsmolekül an der Zellmembran und zum anderen als Schaltstelle im kanonischen Wnt-Signalweg^{9,14,22,23}. Die adhäsiven und transkriptionellen Funktionen von β -Catenin werden durch dessen Tyrosin-Phosphorylierungsstatus und durch Konformationsänderungen des C-Terminus bestimmt²⁴⁻²⁸. Auch für Plakoglobin ist eine Konformationsänderung des C-

Terminus beschrieben, die eine regulierende Funktion in der Adhäsion und Transkription ausübt^{16,20,29}.

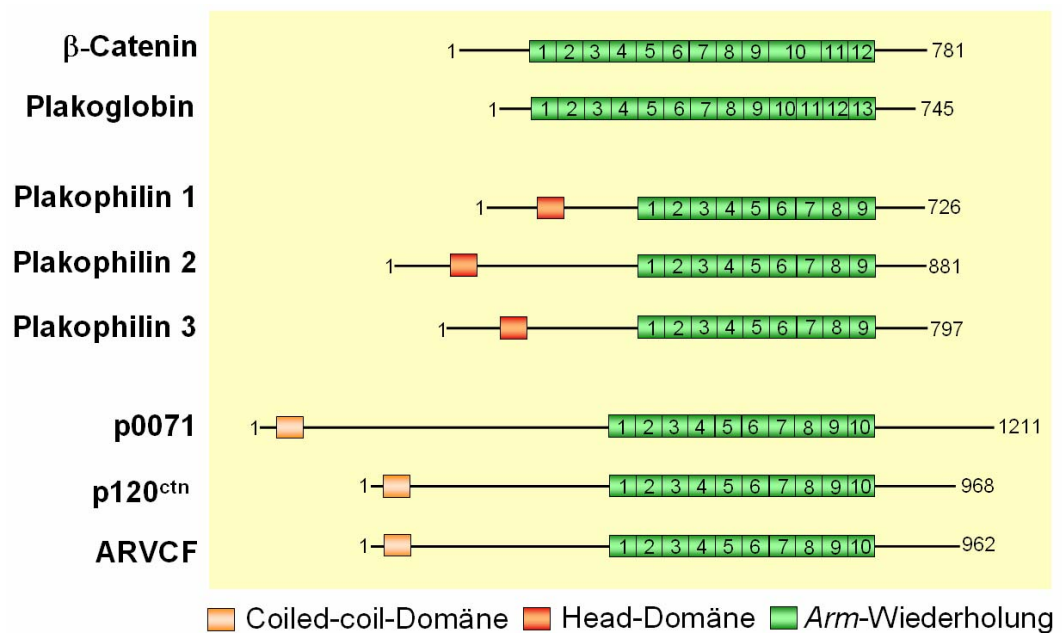


Abb. 1: Die Familie der Armadillo-Proteine sind Adhäsions- und Signalmoleküle. Diese Proteinfamilie besteht aus drei Unterfamilien. Zur Unterfamilie der klassischen Catenine gehören β-Catenin und Plakoglobin. Die Plakophiline 1-3 bilden eine zweite Unterfamilie und besitzen neben neun Arm-Wiederholungen eine konservierte Sequenz im N-Terminus (Head-Domäne). Die p120-verwandten Proteine bilden die dritte Unterfamilie mit p0071, p120catenin und ARVCF, sie haben zusätzlich zu zehn (Arm)adillo-Wiederholungen eine Coiled-coil-Domäne in ihrem N-Terminus.

Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen sind zwei Arten verwandter Zellverbindungen

In der Zelladhäsion sind Armadillo-Proteine an der Bildung von Strukturen beteiligt, welche wichtig für die Stabilität und Integrität von Geweben sind. In Vertebraten sind das zwei Arten verwandter klassischer Zellverbindungen, die Adhärenz-Verbindungen und die Desmosomen (Übersicht³⁰), (Abb. 2). Trotz ihrer engen funktionellen Verwandtschaft ist ihr Aufbau verschieden, sie haben jedoch ein Adhäsionsprotein gemeinsam, das Plakoglobin³¹. Beide Zellverbindungen sind in der Lage, Zellverbände zu stabilisieren, indem sie durch einen Verankerungsmechanismus Zellen miteinander vernetzen und deren Zytoskelett verbinden. Das Zytoskelett der Vertebraten besteht aus verschiedenen Strukturen, wie

Mikrofilamenten (z.B. Aktinfilamente) und Mikrotubuli. Zusätzlich zu diesen Filamenten kann dieselbe Zelle auch weitere Zytoskelettfilamente enthalten, wie beispielweise Intermediärfilamente (Übersicht^{32,33}).

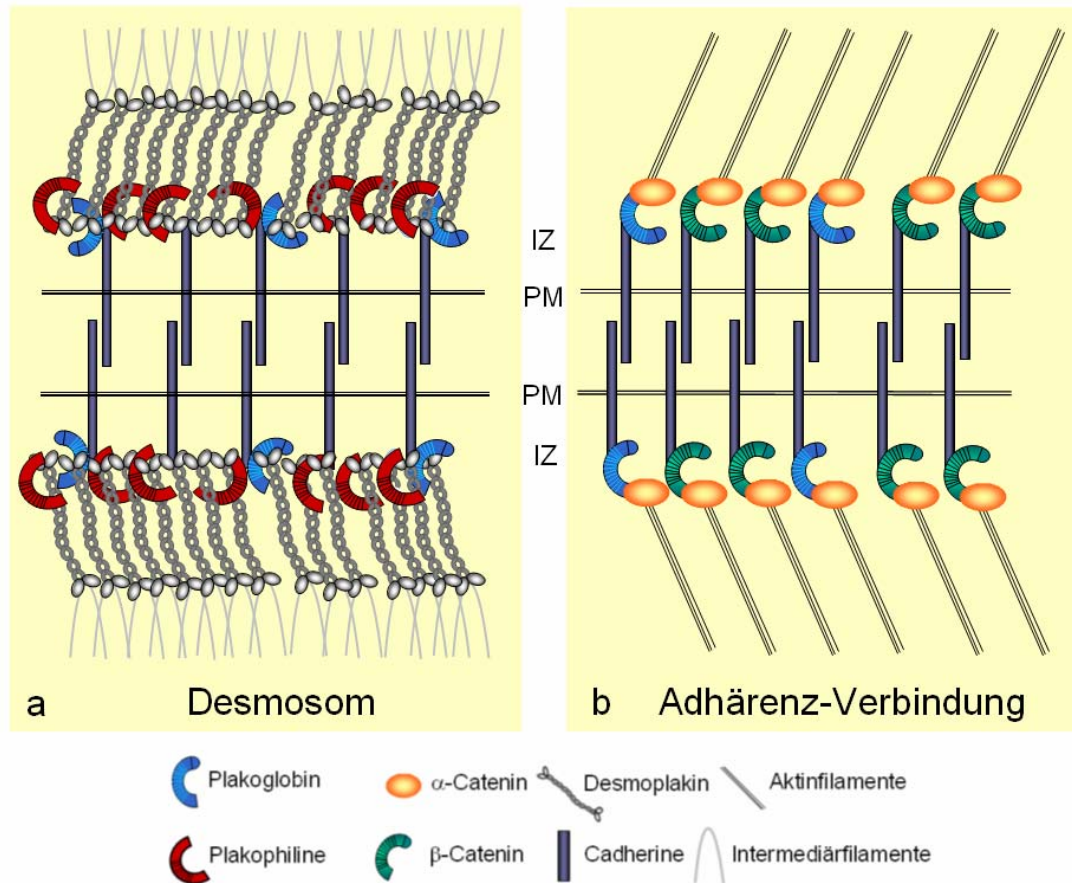


Abb. 2: Die beiden klassischen Zellverbindungen der Vertebraten. Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen haben ein Protein gemeinsam, das Plakoglobin (blau). (a) Desmosomen bestehen aus transmembranen Glykoproteinen, den desmosomalen Cadherinen, welche in ihrem zytosomatischen Teil an Proteine der Arm-Familie binden (Plakoglobin und Plakophiline 1-3 (rot)). Desmoplakin (grau) wiederum interagiert mit den Armadillo-Proteinen und den Intermediärfilamenten. (b) In Adhärenz-Verbindungen binden klassische Cadherine an Plakoglobin und β -Catenin (grün), welche über α -Catenin (orange) das Aktinzytoskelett verankern. PM, Plasmamembran; IZ, intrazellulär.

Der molekulare Aufbau der Desmosomen

Typische Desmosomen (*Maculae adhaerens*) sind in Epithelzellen, Kardiomyozyten, Meningothelzellen sowie in dendritischen Retikulumzellen der Lymphknotenfollikel zu finden, wo sie entsprechend Bündel von Intermediärfilamenten der Typen Zytokeratin, Desmin und Vimentin verankern³⁴⁻³⁸. Da sie

besonders in mechanisch beanspruchten Geweben, wie dem Herz und der Haut vorhanden sind, wird ihnen eine primär stabilisierende Funktion zugeschrieben³⁹⁻⁵⁰ (Übersicht⁵¹⁻⁵³). Desmosomen zeichnen sich durch das Plaque-Protein Desmoplakin aus⁵⁴, welches auch in den *Complexus adhaerens*, einer Zellverbindung in einigen Endothelzellen, identifiziert wurde⁵⁵⁻⁵⁹. In diesen Zellen ist Desmoplakin essentiell für die vaskuläre Entwicklung, wie mit Gendelektionsstudien in der Maus gezeigt werden konnte⁴⁷.

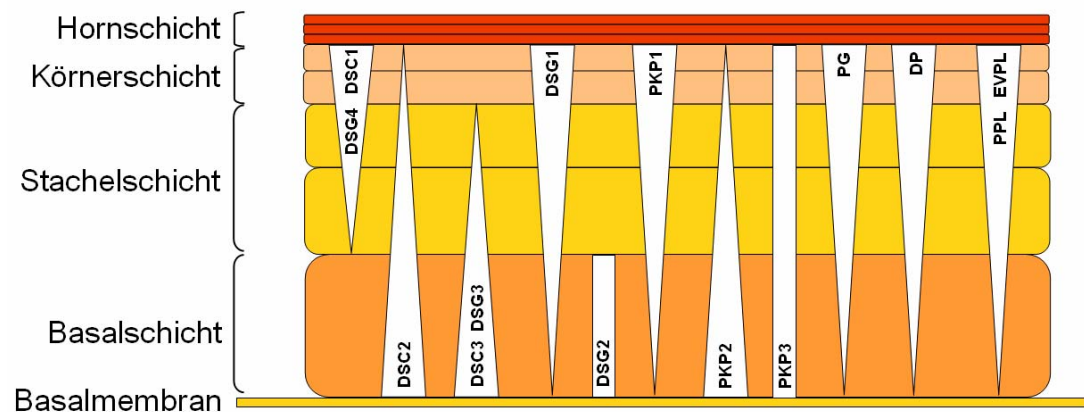


Abb. 3: Desmosomale Proteine in den Zellschichten der Haut. Verschiedene desmosomale Cadherine, Armadillo- und Plakin-Proteine sind in der Haut von Säugetieren in einer differenzierungsabhängigen Weise exprimiert. Wenn Keratinozyten der Basalschicht den Zellzyklus verlassen und in die Stachel- und Körnerzellschicht wandern, erhöht sich die absolute Zahl der Desmosomen (nicht im Bild dargestellt), und es ändert sich deren Zusammensetzung. Keratinozyten der Hornschicht, welche aus zellkernlosen Zellen bestehen enthalten sogenannte Corneodesmosomen. DSC, Desmocollin; DSG, Desmoglein; PG, Plakoglobin; PKP, Plakophilin; DP, Desmoplakin, EVPL, Envoplakin; PPL, Periplakin. Abbildung modifiziert nach⁶⁰.

Die Zusammensetzung eines Desmosoms unterscheidet sich in verschiedenen Zelltypen und ändert sich auch in einzelnen Schichten des mehrschichtigen Epithels, was bisher am besten am Beispiel der Haut beschrieben wurde (Übersicht⁶⁰), (Abb. 3). Die Grundbausteine eines Desmosoms sind jedoch immer gleich und werden aus Proteinen dreier Familien gebildet (Abb. 4a, 4b). Zu diesen Familien gehören die desmosomalen Cadherine, Desmoglein 1-4^{50,61-63} und Desmocollin 1-3⁶⁴⁻⁶⁶, die Armadillo-Familie mit Plakoglobin^{7,31} und den Plakophilinen^{1,67-69} sowie die Plakine mit Desmoplakin, Plectin, Envoplakin und Periplakin (Übersicht⁷⁰). Desmosomen weisen eine scheibenförmige Gestalt auf

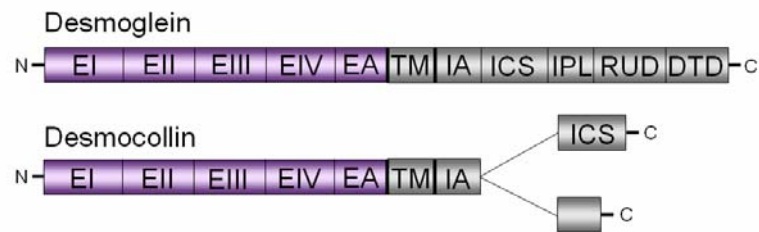
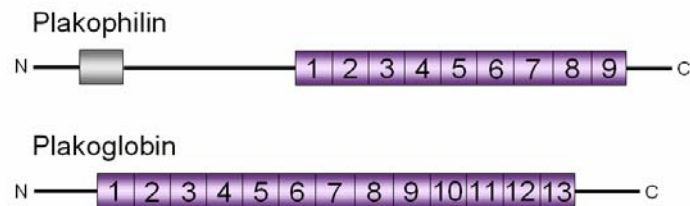
Desmosomale CadherineArmadillo-Familie

Abb. 4a: Schematische Struktur desmosomaler Proteine. Die Hauptbestandteile der Desmosomen sind drei Proteinfamilien, die desmosomalen Cadherine, die Armadillo-Proteinfamilie und die Plakine (siehe Abb. 4b). Desmosomale Cadherine sind Membranmoleküle mit vier extrazellulären Kalziumbindungsstellen. Die vier Mitglieder der Desmoglein-Familie haben hinter der intrazellulären Catenin-Bindungsstelle (ICS) einen verlängerten C-Terminus, welcher weitere Moleküle binden könnte. Alle drei Desmocolline besitzen zwei Spleißvarianten, die 'b' Form besitzt keine Catenin-Bindungsstelle (ICS). IPL, Prolinreiche-Region; RUD, Wiederholungsdomäne; DTD, Desmoglein-Terminaldomäne; EI-EIV, Cadherin-Wiederholungen. Die Armadillo-Familie desmosomaler Proteine besteht aus den Plakophilinen und Plakoglobin. Plakoglobin ist am nächsten verwandt mit β -Catenin, während die Plakophiline näher mit der Unterfamilie der p120catenine verwandt sind. Plakoglobin besitzt dreizehn Arm-Wiederholungen, die Plakophiline haben neun Arm-Wiederholungen zuzüglich einer Head-Domäne (graue Box) in ihrem N-Terminus. Abbildung modifiziert nach⁷¹.

(Durchmesser: 0.1-0.5 μm), im Bereich eines Desmosoms nähern sich die Plasmamembranen zweier Zellen auf etwa 30 nm an. In ihrer Ultrastruktur bestehen Desmosomen aus der Desmoglea, einer Art Mittellinie sowie einem inneren und äußeren Plaque⁷² (Abb. 5). Die Desmoglea ist ein zur Plasmamembran extrazellulärer Bereich, der den interzellulären Raum eines Desmosoms darstellt, in welchen die extrazellulären Domänen der Desmogleine und Desmocolline hineinragen und heterophile (Dsg/Dsc) *trans*- und *cis*-Dimere bilden (Übersicht⁶⁰). Für die Interaktion zwischen desmosomalen Cadherinen ist die Bindung von Ca^{2+} notwendig. In frühen Stadien der Desmosomenbildung ist der Zusammenhalt von

Desmosomen daher kalziumabhängig, irgendwann jedoch bilden sich stabile Desmosomen, die ihre Kalziumabhängigkeit verlieren^{73,74}. Im intrazellulären Bereich eines Desmosoms gibt es auf beiden Seiten der Plasmamembranen symmetrische, dichte Plaques, die in innere und äußere Plaques unterschieden werden. Zum äußeren Plaque gehören der C-Terminus der desmosomalen Cadherine, die Armadillo-Proteine Plakoglobin und die Plakophiline 1-3 und der N-Terminus von Desmoplakin. Zum inneren Plaque zählt der C-Terminus von Desmoplakin und dessen Verbindung mit den Intermediärfilamenten (Übersicht⁵³) und (Abb. 5).

Plakin-Familie

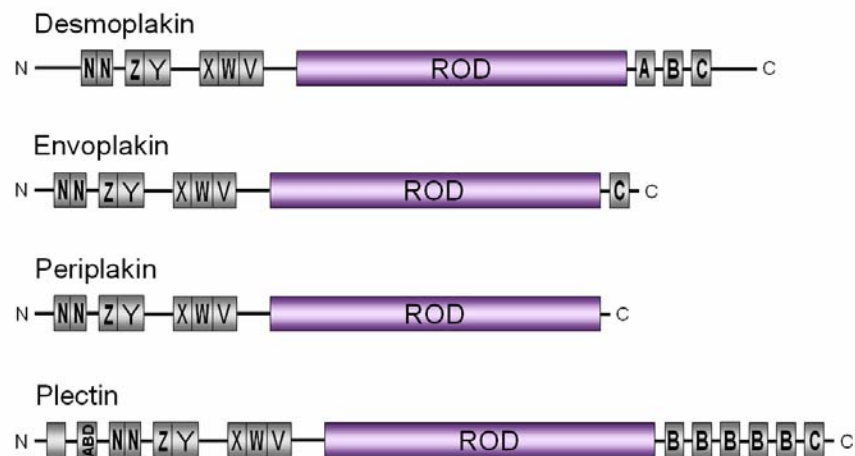


Abb. 4b: Schematische Struktur desmosomaler Proteine. Die Hauptbestandteile der Desmosomen bilden drei Proteinfamilien, die desmosomalen Cadherine, die Armadillo-Proteinfamilie (siehe Abb. 4a) und die Plakine. Plakine sind hantelförmige Proteine, die drei Domänen enthalten, eine zentrale ROD-Domäne und globuläre C- und N-terminale Domänen. Die N-terminale Domäne von Desmoplakin besitzt eine Reihe von α -helikalen Bündeln (NN, Z, Y, X, W und Z), welche mit den Armadillo-Proteinen und Cadherinen interagieren, die C-terminale Domäne von Desmoplakin besitzt sogenannte A-,B-,C-Domänen, die mit den Intermediärfilamenten interagieren. Abbildung modifiziert nach⁷¹.

Die desmosomalen Cadherine Desmoglein und Desmocollin weisen 30% Homologie zueinander und mit den klassischen Cadherinen - typisch für Adhärenz-Verbindungen - auf. Sie alle haben die gleiche extrazelluläre Struktur mit vier charakteristischen Kalziumbindungsstellen, auch Cadherin-Wiederholungen genannt^{61,64,65,75-82}. Die vier Mitglieder der Desmoglein-Familie (MW ~160 kDa) haben einen langen intrazellulären C-Terminus, der hinter der

Catenin-Bindungsstelle (ICS) durch eine Prolinreiche-Region (IPL), eine Wiederholungsdomäne (RUD) sowie eine Desmoglein-Terminaldomäne (DTD) verlängert wird (Übersicht^{53,71}) (Abb. 4a). Der intrazelluläre Bereich der Desmocolline (MW ~115 kDa) ist kürzer als bei Desmogleinen,

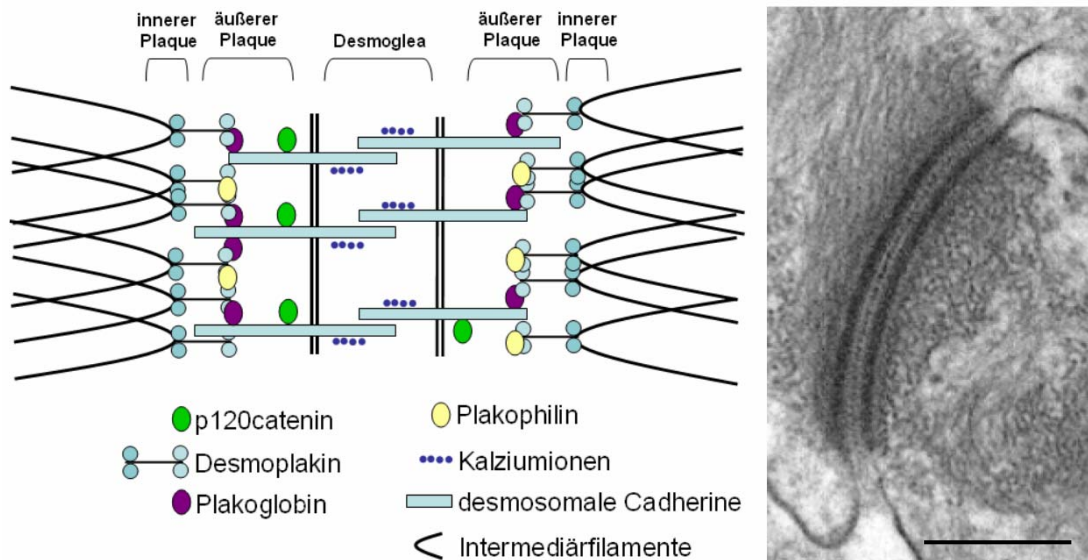


Abb. 5: Die molekulare Organisation eines Desmosoms. Desmosomale Cadherine binden einander heterophil über ihren N-Terminus. Die Desmoglea ist ein zur Plasmamembran extrazellulärer Bereich, der den interzellulären Raum des Desmosoms darstellt. In diesen Raum ragen die extrazellulären Domänen der Desmogleine und Desmocolline hinein. Zum äußeren Plaque gehören der C-Terminus der desmosomalen Cadherine, die Armadillo-Proteine wie Plakoglobin und die Plakophiline und der N-Terminus von Desmoplakin. Zum inneren Plaque zählt der C-Terminus von Desmoplakin und dessen Verbindung mit den Intermediärfilamenten (schematisch links dargestellt). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Desmosoms ist in der Abbildung rechts dargestellt. Maßstab 0.2 µm. Abbildungen modifiziert nach^{53,71}.

außerdem kommen sie in jeweils zwei Spleißvarianten vor⁷⁸. Desmocollin 'b' hat im Gegensatz zu Desmocollin 'a' keine Catenin-Bindungsstelle und kann somit nicht an Plakoglobin binden^{83,84} (Abb. 4a). Während Desmoglein 2 und Desmocollin 2a und 2b in allen Zelltypen mit desmosomalen Zellkontakten exprimiert werden, ist die Synthese der anderen Isoformen weitestgehend auf mehrschichtige Epithelien beschränkt^{63,85,86}. Desmoplakin tritt ebenfalls in zwei Isoformen (Desmoplakin I und II) auf, welche durch differentielles Spleißen entstehen^{87,88}. Desmoplakin I (MW 250 kDa) wird in allen Desmosomen-bildenden Geweben exprimiert. Desmoplakin II (MW 215 kDa) zeigt eine eingeschränkte

Verbreitung und wird beispielsweise nicht im Herzmuskel synthetisiert^{54,89,90}. Desmoplakin I liegt als Homodimer vor und besteht aus drei Domänen, einer zentralen α -helikal-gedrehten Spindel und globulären Domänen an dessen N- und C-Termini⁹¹ (Abb. 4b). Die globulären Domänen des N-Terminus binden an Cadherine und Armadillo-Proteine, während die C-terminalen globulären Domänen mit den Intermediärfilamenten interagieren⁹²⁻⁹⁶. Die Bindung von Plakoglobin (MW 83 kDa) an Desmoplakin sowie an desmosomale Cadherine findet über dessen Armadillo-Wiederholung (13 Armadillo-Motive) statt⁹⁷⁻⁹⁹ (Abb. 4a). Plakoglobin ist eine konstitutive Komponente beider Zellverbindungsarten, der Desmosomen und Adhärenz Verbindungen. Die Plakophiline besitzen neun Armadillo-Motive, die von einem langen N-Terminus und einem kurzen C-Terminus begrenzt werden¹⁰⁰ (Abb. 4a). Alle Isoformen weisen eine konservierte Head-Domäne in ihrem N-Terminus auf^{1,10,69}. Im Gegensatz zu Plakoglobin wurden die Interaktionen der Plakophiline mit desmosomalen Cadherinen und Desmoplakin ausschließlich über den N-Terminus der Plakophiline beschrieben, wobei die spezifische Funktion der Head-Domäne unbekannt bleibt^{96,101}. Ob und welche Bindungspartner mit den Plakophilinen über die Armadillo-Wiederholungen interagieren, wurde bisher nicht publiziert. Die dreidimensionale Struktur einer Armadillo-Wiederholung (mehrere Armadillo-Motive) ist von der kristallinen Struktur von Plakophilin 1, in der neun Armadillo-Motive eine Superhelix aus mehreren α -Helices bilden, bekannt. Die dabei entstehende zylindrische Struktur bildet eine positiv geladene Furche, an welche, ähnlich zu β -Catenin, saure Reste der Interaktionspartner andocken können^{100,102}. Desmosomen sind zum einen durch ihre kompakte Natur und zum anderen durch ihre Verbindung mit dem Zytoskelett schwer lösliche Strukturen, deren Protein-Protein-Interaktionen daher nur eingeschränkt zu analysieren sind^{1,48,103,104}. Viele Publikationen basieren auf *in-vitro*-Experimente und deuten darauf hin, dass zusätzlich zur linearen Cadherin-Armadillo-Plakin-Interaktion eine viel komplexere Natur der Protein-Interaktionen stattfindet (Übersicht⁷¹). Es kommt zu einer lateralen Verflechtung desmosomaler Komponenten über mehrere Interaktionspunkte und somit zur Bildung einer dreidimensionalen, stabilen Struktur¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Ob es jedoch eine Komponente im Desmosom gibt, die für den stabilen Zusammenhalt der desmosomalen Struktur und der Verankerung mit den Intermediärfilamenten im besonderen verantwortlich ist, bleibt weiterhin unklar.

Die Plakophiline sind Bestandteile von Desmosomen

Zur Unterfamilie der Plakophiline gehören drei Mitglieder, die Plakophiline 1-3 (PKP 1-3), welche ausschließlich in Zellverbindungen des desmosomalen Typus vorkommen^{1,67-69,108-110}. Das Armadillo-Protein p0071, auch Plakophilin 4 genannt^{111,112}, hat jedoch eine nähere Verwandtschaft zu einer anderen Armadillo-Unterfamilie, zu der auch p120catenin, ARVCF und Neurojungin gehören, welche vorwiegend in Adhärenz-Verbindungen zu finden sind^{8,111-118} (Abb. 6). Die Plakophiline 1-3 sind juxtamembrane Bestandteile der desmosomalen Plaques in welchen sie eng mit anderen Armadillo-Proteinen, wie Plakoglobin sowie den desmosomalen Cadherinen und Desmoplakin, assoziiert sind.

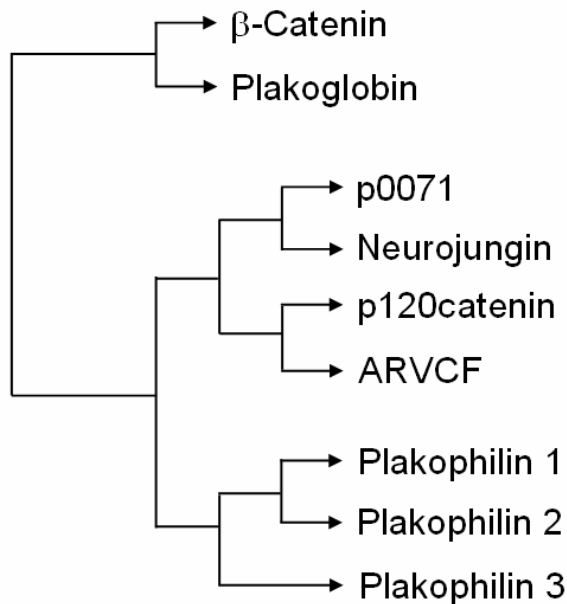


Abb. 6: Dendrogramm der Aminosäuresequenz-Homologien zwischen verschiedenen Armadillo-Proteinen.

Aminosäuresequenzen der Arm-Proteine mit Adhäsions- und Signaltransduktionsfunktion wurden mit dem „TREE“-Algorithmus der HUSAR – Sequenzanalyse - Software verglichen. Die Verwandtschaft der verschiedenen Proteine ist im Dendrogramm dargestellt. Die verwendeten Sequenzen waren humane Sequenzen für β-Catenin (NP_001895), Plakoglobin (NP_002221), p0071 (NP_003619), Neurojungin

(NP_001323), p120catenin (AB002382), ARVCF (U51269), PKP1a (NP_001005337), PKP2a (NP_001005242) und PKP3 (NP_009114). Übernommen aus⁶⁹.

Die drei Plakophilin-Isoformen sind unterschiedlich exprimiert. Plakophilin 1 ist suprabasal, hauptsächlich in Desmosomen der Stachel- und Körnerzellschicht, aber auch schwach in der Basalzellschicht der mehrschichtigen Epidermis sowie in anderen mehrschichtigen und komplexen Epithelien exprimiert^{10,68}. Plakophilin 2 ist das am weitesten verbreitete Plakophilin. Es ist in Desmosomen aller proliferierenden Epithelien, vorwiegend in der Basalschicht, aber auch in Desmosomen von Tumoren, Kardiomyozyten und Purkinje-Zellen des Herzens sowie in Lymphknotenfollikeln und der Leber zu finden^{1,69,119,120}. Plakophilin 3 zeigt mit der Anwesenheit in den meisten ein- und mehrschichtigen Epithelien ein

intermediäres Expressionsmuster. In Desmosomen der Epidermis ist es in allen Schichten gleich stark vertreten⁶⁹ (für Expressionsmuster siehe auch Tabelle 1).

Die mRNAs von Plakophilin 1 und Plakophilin 2, nicht jedoch von Plakophilin 3, kommen in zwei Spleißformen vor^{1,10}. Bei Plakophilin 2 unterscheiden sich beide Transkripte durch eine Exoninsertion von 132 bp (44 Aminosäuren) zwischen dem zweiten und dritten Armadillo-Motiv (Abb. 18). Die kürzere, humane Plakophilin 2-Variante (Plakophilin 2a) besteht aus 837 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 92 kDa, die längere Form (Plakophilin 2b) hat mit 881 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 97 kDa¹. Die intrazelluläre Lokalisierung und zelltypspezifische Verteilung von Plakophilin 2b entspricht der kürzeren Spleißvariante Plakophilin 2a, obwohl es gegenüber Plakophilin 2a deutlich schwächer exprimiert wird.

Wie schon beschrieben, wurden die Plakophiline 1-3 neben ihrer Lokalisierung an der Membran ebenfalls im Zellkern detektiert. Für Plakophilin 1 wurde gezeigt, dass die Spleißform 1a im Zellkern sowie an der Membran lokalisiert, während Plakophilin 1b nur im Zellkern gefunden wurde¹⁰. Plakophilin 2a und 2b wurden jedoch beide in Desmosomen und im Zellkern nachgewiesen¹. Im Gegensatz zu PKP1 und PKP2, welche auch im Zellkern einiger Zelltypen detektiert wurden, die keine Desmosomen bilden, wie beispielsweise in Fibroblasten, wurde PKP3 nur im Zellkern von Zelltypen detektiert, die Desmosomen besitzen^{1,69,109}. Plakophilin 2 ist zudem in Assoziation mit dem RNA-Polymerase III-Komplex beschrieben worden sowie als Substrat der Tyrosinkinase Tak-1^{121,122}. Die Rolle der Plakophiline in der Signaltransduktion bleibt jedoch weiterhin offen.

Das Zusammenspiel von Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen

Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen sind funktionell verwandt. In Adhärenz-Verbindungen stellen β -Catenin aber auch Plakoglobin die Verbindung zwischen den klassischen Cadherinen (z.B. N-Cadherin, E-Cadherin) und α -Catenin dar, so dass die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett ermöglicht wird¹²³⁻¹²⁸ (Abb. 2). Die auf 20 nm angenäherten Plasmamembranen sind im Bereich der Adhärenz-Verbindungen über einen 10-30 nm dicken, submembranen Plaque mit dem Aktinfilamentsystem verbunden (Übersicht^{128,129}). Adhärenz-Verbindungen bilden morphologisch unterschiedliche Formen wie gürtelförmig um die Zelle verlaufende *Zonulae adhaerens*, streifenförmige *Fasciae adhaerens*

und punktförmige *Puncta adhaerens*¹³⁰. Sie sind in allen Epithelgeweben sowie Gefäßendothelien und, im Unterschied zu Desmosomen, auch in Zellen mesodermalen Ursprungs, wie der Muskulatur aber auch im Nervengewebe zu finden^{55,56}.

Adhärenz-Verbindungen sind jedoch evolutionär älter als Desmosomen und werden in der Regel auch früher in der Entwicklung eines Organismus bzw. Organs detektiert¹³¹⁻¹³⁴. Zum Beispiel greifen in der frühen Keratinozyten-Adhäsion Filopodien benachbarter Zellen, getrieben durch Aktinpolymerisierung, ineinander und bilden eine Reihe von *Puncta adhaerens* („Adhärenz-Reißverschluss“, bestehend aus punktförmigen Adhärenz-Verbindungen)¹³⁵. Desmosomen stabilisieren die Adhäsion, indem sie sich zusätzlich zwischen den Filopodien bilden¹³⁵. Weitere Zellkulturexperimente weisen ebenfalls auf ein Zusammenspiel von Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen hin. Die Verwendung von E-Cadherin-Antikörpern oder dominant-negativem N-Cadherin führt zum Verlust von Adhärenz-Verbindungen und inhibiert zusätzlich die Bildung von Desmosomen. Epithelzellen, die alle desmosomalen Komponenten exprimieren, aber keine E-Cadherin-Plakoglobin-Komplexe bilden können, weisen auch keine Desmosomen auf^{62,136,137}. Auch die gewebsspezifische Desmoplakindeletion in der Epidermis der Maus zeigt, dass Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen voneinander abhängen. Der Verlust von Desmoplakin führt nicht nur zur Bildung von Desmosomen, die keine Assoziation mehr mit dem Zytoskelett aufweisen, sondern auch zu einer reduzierten Anzahl von Adhärenz-Verbindungen in der Basalschicht der Epidermis⁴⁸. In verschiedenen Transfektionsstudien mit stabilen Zelllinien konnten auch „intermediäre“ Zellverbindungen detektiert werden, in denen zum Beispiel Desmoplakin unter Anwesenheit der desmosomalen Proteine Plakophilin 2 und Desmoglein 2 an Adhärenz-Verbindungen lokalisiert¹³⁸.

In den Glanzstreifen des Herzens existieren verschiedene Arten von Zellverbindungen

Auch in einigen Geweben kommen Arten intermediärer Zellverbindungen vor (Abb. 7), in denen Proteine aus beiden Strukturen koexistieren, zum Beispiel in den Glanzstreifen des Herzens¹³⁹. Kardiomyozyten werden über Glanzstreifen, dies sind besonders feste Verzahnungen zwischen den Zellen, miteinander verbunden

(Abb. 8). Innerhalb dieser Glanzstreifen befinden sich neben Gap Junctions, die wichtig für die Erregungsleitung sind, auch die adhäsiven Zellverbindungen, wie Adhärenz-Verbindungen und Desmosomen und solche intermediärer Natur¹³⁹. Inzwischen werden die gesamten adhäsiven Zellverbindungen des Herzens auch häufig als *Area composita* bezeichnet¹³⁹. In den Glanzstreifen der Kardiomyozyten sind die für Adhärenz-Verbindungen typischen Zelladhäsionsmoleküle wie N-Cadherin, β -Catenin, p120catenin und α -Catenin exprimiert sowie die Desmosomtypischen Moleküle Desmoglein 2, Desmocollin 2a und 2b, Plakophilin 2, Plakophilin 2,

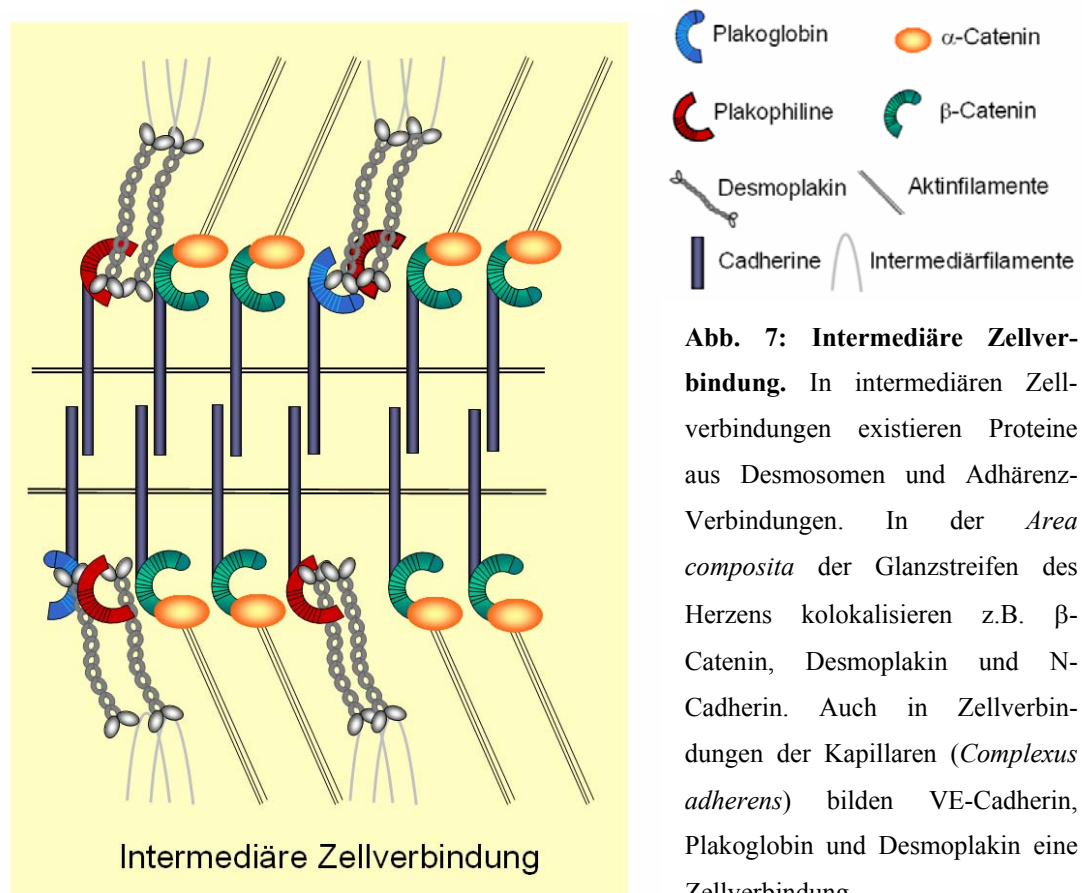


Abb. 7: Intermediäre Zellverbindung. In intermediären Zellverbindungen existieren Proteine aus Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen. In der *Area composita* der Glanzstreifen des Herzens kolokalisieren z.B. β -Catenin, Desmoplakin und N-Cadherin. Auch in Zellverbindungen der Kapillaren (*Complexus adherens*) bilden VE-Cadherin, Plakoglobin und Desmoplakin eine Zellverbindung.

Plakoglobin und Desmoplakin I (^{1,63,86,119} und siehe oben). Adhärenz-ähnliche Verbindungen verankern das Aktin/Myosin-Zytoskelett. Auf diese Weise werden Myofibrillen, die entscheidend für die Muskelkontraktion sind, fest an der Zellmembran verankert. Die Zelladhäsion wird zusätzlich durch die Verankerung der Intermediärfilamente in Desmosom-ähnlichen Verbindungen verstärkt. Auch in Zellverbindungen der Kapillaren, nicht jedoch größerer Blutgefäße, gibt es intermediäre Zellverbindungen, in denen VE-Cadherin mit den Proteinen Plakoglobin und Desmoplakin koexistiert (*Complexus adherens*)^{55,56,140}.

Zellverbindungen spielen eine Rolle in der frühen Embryonalentwicklung

Deletionen und Mutationen desmosomaler Proteine in der Maus zeigen wie wichtig Zellverbindungen während der gesamten Embryonalentwicklung sowie im adulten Organismus für die Stabilität von Geweben sind. In der frühen murinen Blastozyste (E3.5) entstehen Desmosomen in polarisierten Trophoektodermzellen im 32-Zellstadium^{131,132}. Ihre Bildung ist eng mit der Blastozuelbildung und der damit verbundenen Expansion des Eizylinders verknüpft, in dem sie eine stabilisierende Rolle spielen. Zu diesem Zeitpunkt haften nur Zytokeratinfilamente an den Desmosomen an^{131,132}. Wie wichtig Desmosomen in der frühen

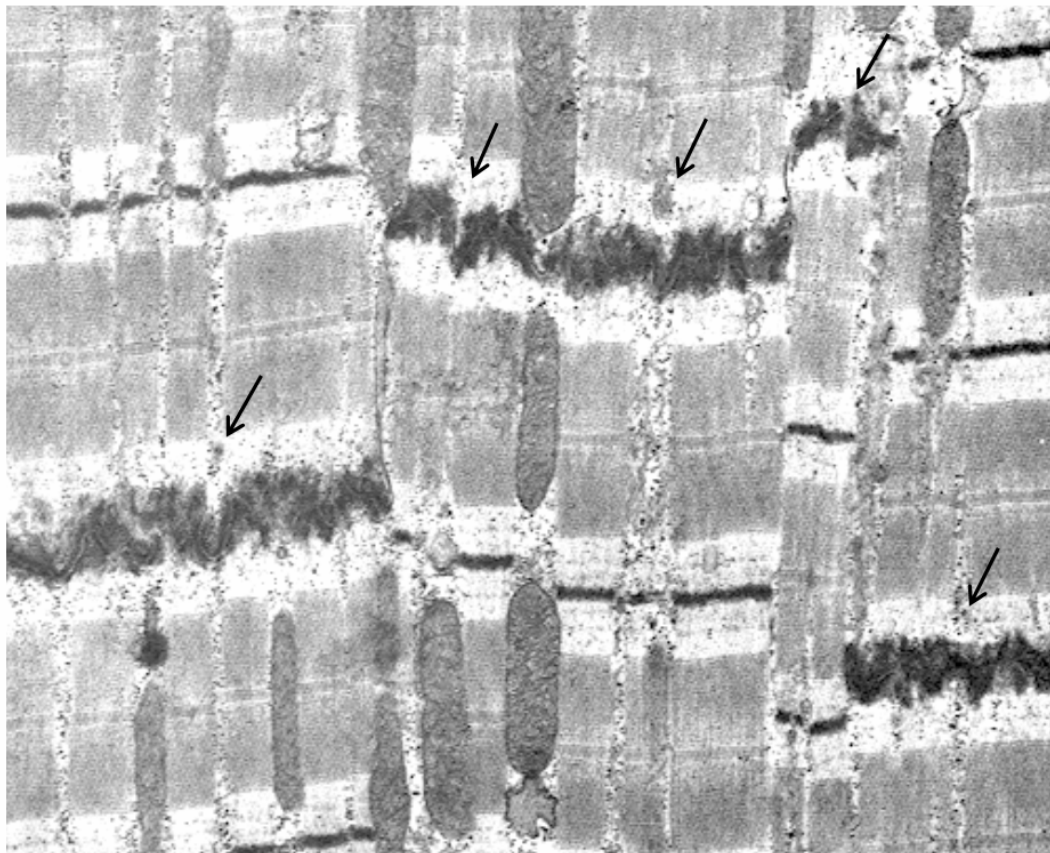


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Herzmuskelschnittes. Die Glanzstreifen (schwarze Pfeile) des Herzens sind reich an Adhärenz-Verbindungen und Desmosomen. Myofibrillen sind über Adhärenz-ähnliche Verbindungen in den Glanzstreifen des Herzens verankert und wichtig für die Muskelkontraktion. Intermediärfilamente binden an Desmosomen und sind wichtig für die Stabilität des Herzmuskels.

Embryonalentwicklung sind, zeigt der Verlust von Desmoplakin und Dsg2 in der Maus, welcher bereits zu embryonaler Letalität im Blastozystenstadium führt^{141,142}. Bis zu zwei Tagen nach dem Beginn der Gastrulation (E6.0) ist Zytokeratin das

einziges Intermediärfilament in embryonalen Epithelien, erst danach setzt im Mesoderm die Expression von Vimentin-Filamenten ein. In diesen mesodermalen Zellen sind Vimentin-Filamente jedoch spärlich gepackt, im Gegensatz zu den dicht gepackten Zytokeratin-Bündeln des embryonalen Ektoderms und viszeralen Endoderms. Die mesodermalen Zellen besitzen daher keine Desmosomen jedoch Adhärenz-Verbindungen^{131,132}.

Desmosomale Proteine in der späteren Embryonalentwicklung und bei Krankheiten

In der späteren Embryonalentwicklung scheinen desmosomale Proteine im Herz aber auch der Haut von besonderer Bedeutung zu sein. Identifizierte Mutationen beim Menschen sowie generierte Mutationen in der Maus führen häufig zu Phänotypen, bei welchen die Funktion dieser beiden Organe negativ beeinträchtigt ist (siehe Tabelle 1). In den Autoimmunkrankheiten *Pemphigus vulgaris* (Epidermis und Schleimhaut betreffend) und *Pemphigus foliaceus* (ausschließlich Epidermis betreffend) richten sich körpereigene Antikörper gegen die extrazellulären Domänen von Desmoglein 3 und 4 beziehungsweise Desmoglein 1^{50,62,143,144}. *Pemphigus vulgaris*-Patienten leiden an Läsionen der Schleimhäute und Haut, die ohne Kortikosteroid-Therapie tödliche Folgen haben. Für Desmoglein 1 sind außerdem beim Mensch heterozygote N-terminale Deletionen (G→A Transition in der 3' Spleißakzeptorstelle von Intron 2) beschrieben, die zu Hautverhornung (Keratoderma) führen⁴³. Deletionen desmosomaler Cadherine in der Maus ähneln den Phänotypen menschlicher Krankheiten, sie führen zu Läsionen in Schleimhäuten (Dsg3)^{39,145,146} bzw. epidermaler Fragilität und Läsionen einhergehend mit Hyperproliferation und Haarverlust (Dsg4, Dsc1)^{46,50} (siehe Tabelle 1). Plakophilin 1-Mutationen beim Menschen resultieren in Hautfragilität und ein Ektodermales-Dysplasie-Syndrom, was mit der Expression von Plakophilin 1 in bestimmten mehrschichtigen Epithelien und dessen Funktion in der Adhäsion der Keratinozyten konsistent ist^{10,42,68,147-149}. Im beschriebenen Fall (McGrath *et al.*) trägt der betroffene Patient Mutationen (910C→T, 1132ins28), die zu verfrühten STOP-Kodons und einem kompletten Verlust der Plakophilin 1-Expression in der Haut führen⁴². Eine Triade von Phänotypen aus Arrhythmogener-Rechts-Ventrikulärer-Kardiomyopathie (ARVC), krausem Haar und Keratoderma wurde bei Patienten beschrieben, die an Mutationen in

Desmoplakin leiden. Die C-terminalen, homozygoten Mutationen (7901delG, 7402G→C) führen zu einem stabilen, trunkierten Desmoplakin-Protein^{45,49}. Es sind außerdem Mutationen im Gen für Desmoplakin beschrieben, die nur zu einigen der oben genannten Krankheitsbilder führen. Eine heterozygote Mutation (1176C→G; S299R), in der es zu einem Aminosäurerestaustausch kommt, bedingt ausschließlich dominant vererbte ARVC¹⁵⁰, während eine weitere Mutation (1323C→T; Q331X) zu einem Nullallel und Haploinsuffizienz führend, Keratoderma auslöst^{151,152}. Mäuse, die eine Nullmutation für Desmoplakin besitzen, sind aufgrund von Adhäsionsdefekten in extraembryonalen Geweben und Fehlern in der Expansion/Proliferation des Eizylinders embryonal letal um E6.5¹⁴¹.

Tabelle 1: Expression und Phänotypen desmosomaler Proteine

<i>Protein</i>	<i>Expression</i>	<i>Phänotyp der Maus-Deletionen</i>	<i>Phänotyp der humanen Mutation</i>	<i>Literatur</i>
DSC1	- ubiquitär in epithelialen Geweben - obere Epidermisschichten (Stachel- und Körnerzellschicht)	- epidermale Fragilität - Hyperproliferation - Haarverlust	<i>unbekannt</i>	46,153,154
DSC2	- ubiquitär in desmosomalen Geweben (z.B. Zunge, Ösophagus Herz, Lymphknoten) - untere Epidermisschichten (hauptsächlich Basalschicht)	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>	154
DSC3	- in mehrschichtigen Epithelien (e.g. Epidermis, Trachee) - untere Epidermisschichten (Basal- und Stachelzellschicht)	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>	153,154
DSG1	- obere Epidermisschichten (hauptsächlich Stachel- und Körnerzellschicht)	<i>unbekannt</i>	- Keratoderma	43,153,155
DSG2	- ubiquitär in desmosomalen Geweben (z.B. Herz) - untere Epidermisschichten (hauptsächlich Basalschicht)	- sehr früh embryonal letal (Blastozyste)	<i>unbekannt</i>	63,142
DSG3	- untere Epidermisschichten (Basal- und Stachelzellschicht) - Schleimhäute	- epidermale Fragilität - Läsionen in Schleimhäuten (Schnauze und Augen) - Haarverlust	<i>unbekannt</i>	39,63,144-146,153
DSG4	- obere Epidermisschichten - Haarfollikel	- epidermale Fragilität - Hyperproliferation - Haarverlust	- abnormale Haar-follikel - Haarverlust	50
PKP1	- mehrschichtige Epithelien - obere Epidermisschichten (hauptsächlich Stachel- und Körnerzellschicht)	<i>unbekannt</i>	- epidermale Fragilität (Ektodermale Dysplasie)	10,42,68
PKP2	- ubiquitär in desmosomalen Geweben (z.B. Herz) - alle Epithelien - untere Epidermisschichten (hauptsächlich Basalschicht)	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>	1,120
PKP3	- in vielen einschichtigen und mehrschichtigen Epithelien - untere und obere Epidermisschichten gleich	<i>unbekannt</i>	<i>unbekannt</i>	69,109
PG	- ubiquitär in desmosomalen Geweben (z.B. Herz) - in allen Epithelien - in allen Epidermisschichten - Endothelzellen	- embryonal letal (E12) - Risse in Herzwänden - epidermale Fragilität	- Keratoderma - krauses Haar - ARVC	40,41,44,153
DP	- ubiquitär in desmosomalen Geweben (z.B. Herz) - in allen Epithelien, in allen Epidermisschichten - Endothelzellen	Tetraploide Fusion: - embryonal letal (E10) - Adhäsionsdefekte in Herzmuskel, Neuroepithel und Haut	- Keratoderma - krauses Haar - ARVC	45,47-49,141,151-153

Es wurde gezeigt, dass Desmoplakin nicht nur für die Anhaftung der Keratinfilamente notwendig ist, sondern auch für die Bildung und Stabilität von Desmosomen in extraembryonalen Geweben während der frühen Embryonalentwicklung. Zur Umgehung eines extraembryonalen Phänotyps wird von der sogenannten tetraploiden-Fusion Gebrauch gemacht. In diesem Verfahren werden diploide Zellen mit entsprechender Nullmutation mit tetraploiden wildtypischen Zellen aggregiert. Während das embryonale Gewebe der Chimären ausschließlich aus diploiden Zellen entsteht, tragen die tetraploiden Wt-Zellen zum extraembryonalen Gewebe bei. Eine solche Desmoplakin-Nullmutation führt zu den typischen späteren Adhäsionsphänotypen (E10) in Desmosomen-enthaltenden Geweben, wie Myokard, Neuroepithel und Epidermis, aber auch der Mikrovaskulatur, welche spezielle Zellverbindungen mit Desmoplakin enthält^{47,48}. Protonotarios *et al.* beschrieben (1986) die Naxos-Krankheit, ein beeindruckend ähnliches Syndrom aus ARVC, Keratoderma und krausem Haar, vorkommend in einer Population auf der griechischen Insel Naxos¹⁵⁶. Die Krankheit wurde später auf eine C-terminale autosomal rezessiv vererbte Mutation (2157_2158delTG) im Gen für Plakoglobin zurückgeführt, die zur Expression eines trunkierten Proteins führt⁴⁴. Dieser komplexe Phänotyp involviert möglicherweise Adhäsions- und Signaltransduktionsdefekte, da bei der Mutation der C-Terminus betroffen ist, welcher ähnlich wie bei β -Catenin eine regulatorische Funktion ausübt. In Mäusen führt der vollständige Verlust der Plakoglobinexpression zu Fehlfunktionen in der Zelladhäsion von Myokard und Epidermis^{40,41}. Der Hautphänotyp zeichnet sich durch reduzierte Desmosomenzahl aus, was sich im Ablösen der oberen Epidermisschichten äußert⁴⁰. Auffällige Analogien existieren zwischen Phänotypen des Menschen und der Maus. Bisher wurden weder Gendeletionen für Plakophilin 2 in der Maus, noch Mutationen im Gen für Plakophilin 2 beim Menschen beschrieben.

Ziel dieser Arbeit

Um eine Funktion für individuelle Mitglieder der Armadillo-Familie zu definieren, macht unsere Arbeitsgruppe von genetischen Mausmodellen Gebrauch. Das Ziel meiner Arbeit war die Analyse der Plakophilin 2-defizienten Maus. Bisher gab es keine Erkenntnisse zur Funktion von Plakophilinen *in vivo*. Da Plakophilin 2 im Gegensatz zu seinen Familienmitgliedern Plakophilin 1 und 3 auch außerhalb von

Epithelien ein breites Expressionsmuster aufweist, war dessen Funktion für uns besonders interessant. Mit Hilfe histologischer, immunologischer, elektronenmikroskopischer und biochemischer Analysen habe ich die Funktion von Plakophilin 2 während der Embryonalentwicklung aufgedeckt. Dabei war es von zentralem Interesse, die besondere Rolle und Aufgabe von Plakophilin 2 in der Zelladhäsion zu beschreiben. Interessanterweise konnten durch unser Mausmodell auch Erkenntnisse zu einer menschlichen Krankheit -ARVC- gewonnen werden.

Ergebnisse

Erzeugung Plakophilin 2-defizienter Mäuse

Zur Deletion des Plakophilin 2-Gens wurde die Technik der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus (ES-Zellen) angewandt¹⁵⁷. Auf der Grundlage der genomischen Sequenz des Plakophilin 2-Gens (Chromosom 16) wurde ein Rekombinationsvektor generiert. Dieser Rekombinationsvektor enthielt den Bereich über das erste und zweite Exon des Plakophilin 2-Gens. Der Rekombinationsvektor wurde so konstruiert, dass ein 7.8 Kb genomisches Fragment, welches von der NotI Schnittstelle in Exon 1 bis zur BamHI Schnittstelle in Intron 1 reichte, durch exogene Sequenzen ersetzt wurde. Die exogene Sequenz bestand aus einem Neomycin-Resistenzmarkergen (neo), welches in entgegengesetzter Leserichtung zum Plakophilin 2-Gen eingefügt wurde (Abb. 9a). Es wurde eine Nullmutation im Plakophilin 2-Gen generiert, da das Vorhandensein der Neomycin-Kassette ein Spleißereignis zwischen Exon 1 und Exon 2 verhindert und es nach 43 Aminosäuren zu einem verfrühten STOP der Plakophilin 2-Translation kommt. Homolog rekombinierte ES-Zellklone mit heterozygoter Plakophilin 2-Mutation wurden in Blastozysten injiziert und in den Uterus scheinschwangerer Ammenmäuse überführt. Verpaarungen von chimären Nachkommen mit C57Bl/6 Tieren ergaben in der F1-Generation heterozygot-mutierte Plakophilin-Mäuse. Mittels Southern-Blot-Analysen und PCR wurden sämtliche Nachkommen auf ihren Genotyp untersucht. Somit konnten Wildtypen von heterozygoten und homozygoten Tieren unterschieden werden (Abb. 9b, c). Für Southern-Blot-Analysen wurde genomische DNA mit XbaI oder HindIII verdaut. Eine genomische Plakophilin 2-DNA-Sonde (ext) erkannte im mutierten Plakophilin 2-Allel ein neues Fragment von 10 Kb, während das entsprechende Wildtyp-Fragment des XbaI-Verdau eine Länge von 16 Kb aufwies. Die Neomycin (neo) -Sonde erfasste in einem HindIII-Verdau ein neues Fragment von 4.5 Kb im mutierten Allel (Abb. 9b).

Verpaarungen zwischen heterozygoten Tieren ergab keine lebenden Plakophilin 2-defizienten Nachkommen, was vermuten ließ, dass homozygote Pkp2-Embryonen während der Embryonalentwicklung sterben. Um den Zeitpunkt des Todes festzustellen, wurden Embryonen aus verschiedenen Entwicklungsstadien

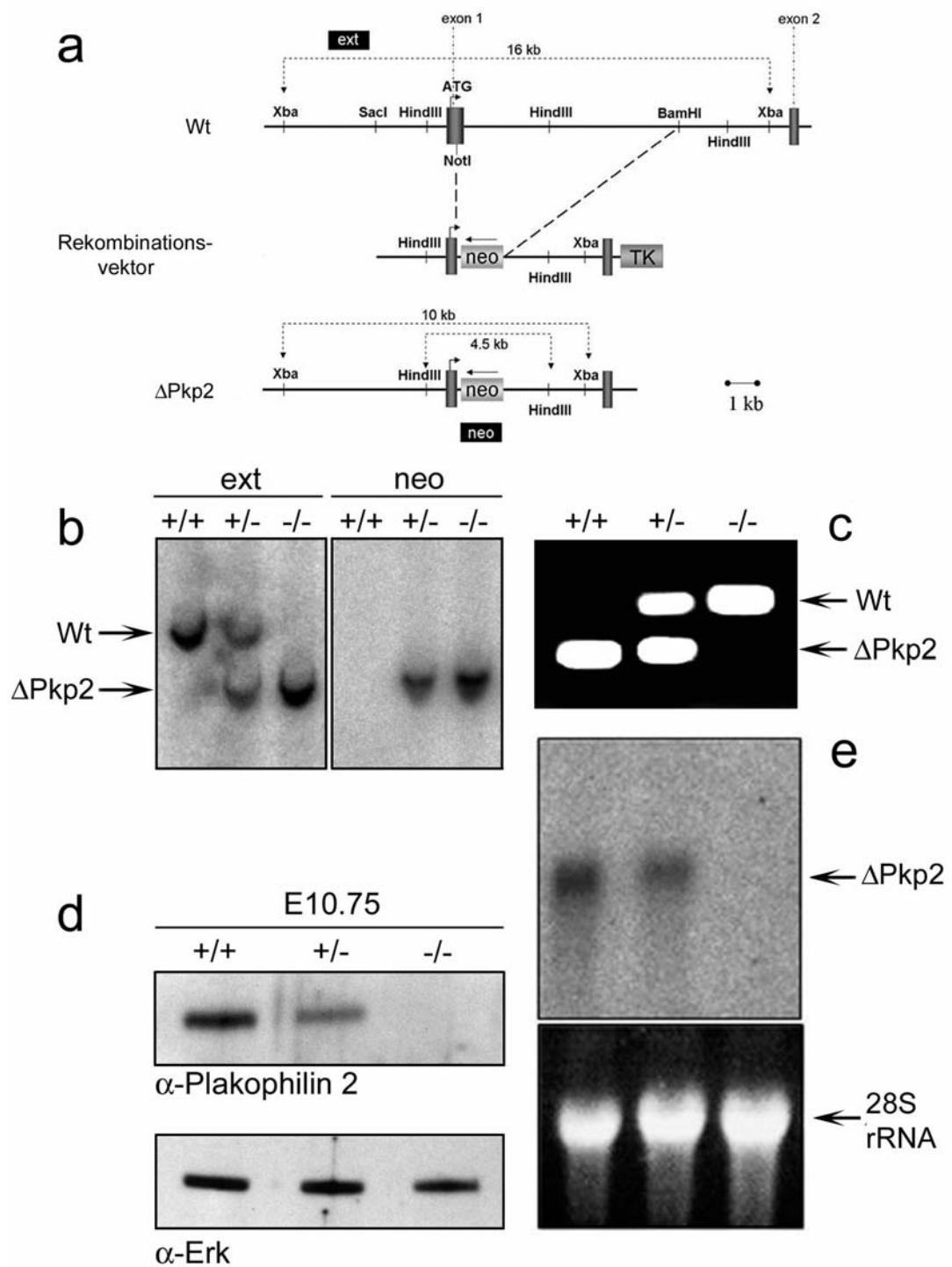


Abb. 9 a-e: Strategie der Plakophilin 2-Deletion in der Maus. (a) Schematische Darstellung des Plakophilin 2-Rekombinationsvektors und des wildtypischen sowie mutierten Pkp2-Lokus. Exonsequenzen sind mit grauen Boxen dargestellt, die neo-Kassette wurde in entgegengesetzte Leserichtung an Kodon 43 des ersten Exons eingefügt. Die Sonden für die Southern-Hybridisierung sind mit schwarzen horizontalen Boxen gekennzeichnet (ext, neo). Die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente durch den XbaI- und HindIII-Verdau sind angegeben. (b) Southern-Blot des PKP 2-Lokus der E10.75 Wt (+/+), Plakophilin 2-heterozygoten (+/-) und -homozygoten (-/-) Embryonen mit beiden Sonden (ext) und (neo). (c) PCR des Plakophilin 2-Lokus von Wt (+/+),

Plakophilin 2-heterozygoten (+/-) und -homozygoten (-/-) Embryonen. (d) Western-Blot der Plakophilin 2-Expression in wildtypischen, heterozygot- und homozygot-mutierten Embryonen (E10.75). Erk diente als Ladekontrolle. (e) Northern-Blot der Plakophilin 2-Expression in wildtypischen, heterozygot- und homozygot-mutierten Embryonen E10.75. Die 28S-rRNA diente als Ladekontrolle.

genotypisiert und inspiziert. Bis Tag 10.75 der Embryogenese wurde die nach Mendelschen Regeln erwartete Anzahl homozygoter Mutanten beobachtet (Tabelle 2). Jedoch wiesen die Mutanten starke Blutungen in die Perikardial- und Peritonealhöhle auf. Ab E11.5 sank die Zahl der lebensfähigen Pkp2^{-/-}-Embryonen, was durch fehlenden Herzschlag beurteilt werden konnte. Um die Anwesenheit

Tabelle 2: Lebensfähigkeit der Embryonen aus Pkp2-heterozygoten Verpaarungen

Alter	+/+	+/-	-/-
E9.75	32% (15)	40% (19)	28% (13)
E10.75	26% (25)	48% (46)	26% (25)
E11.5	29% (21)	49% (35)	22% (16)
			7%* (5)
E13.75	30% (4)	69% (9)	0%

* kennzeichnet die Anzahl der toten homozygot-mutierten Embryonen, die Anzahl der getesteten Embryonen steht in Klammern

von PKP2 auf Proteinebene zu verifizieren, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Embryonen (E10.75) lysiert und mit einem gegen den C-Terminus von Plakophilin 2 gerichteten Antikörper auf das Vorhandensein von Plakophilin 2 oder verkürzten Plakophilin 2-Formen untersucht. Die Ergebnisse zeigten die Abwesenheit von Plakophilin 2 oder verkürzten Proteinen in homozygoten Embryonen. In heterozygoten Embryonen wurde gegenüber wildtypischen Embryonen eine Reduktion des Plakophilin 2-Proteins deutlich (Abb. 9d). In Northern-Blot-Analysen detektierte eine C-terminale Sonde in Plakophilin 2-defizienten Embryonen (E10.75) keine Plakophilin 2-mRNA. Heterozygote Pkp2-Embryonen zeigten, wie erwartet, eine reduzierte Menge an Plakophilin 2-mRNA im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 9e).

Herzdefekte in Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen

Zur Bestimmung der Lokalisierung von Plakophilin 2 in wildtypischen Embryonen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Plakophilin 2 ist in wildtypischen Embryonen um E10.75 markant in den Kardiomyozyten der Atrien und im Ventrikel des Herzens exprimiert, während homozygote Embryonen kein Plakophilin 2 exprimieren. Um E13.75 ist Plakophilin 2 intensiv in wildtypischen Kardiomyozyten sichtbar, jedoch schwächer im umgebenden Epikard (Abb. 9 f, g).

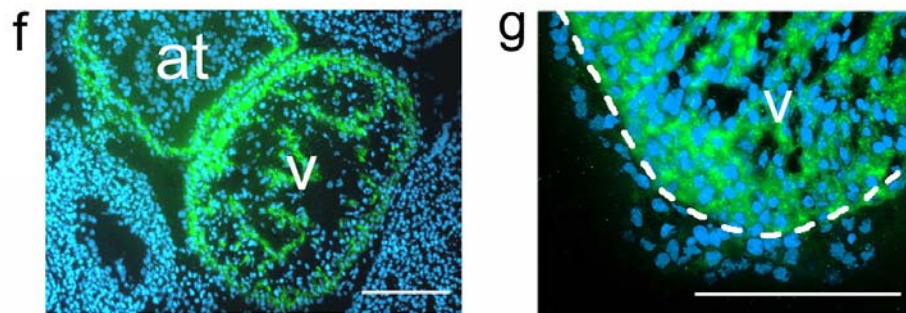


Abb. 9 f, g: Immunfluoreszenz von Plakophilin 2 an Wt-Herzen, (f) E10.75 und (g) E13.75. Der Antikörper (grüne Fluoreszenz) ist gegen den C-Terminus von Pkp2 gerichtet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen Myokard und Epikard. At, Atrium; V, Ventrikel; Maßstab, 200 μ m.

Um die Ursache der embryonalen Letalität festzustellen, wurden Embryonen von E9.5 und späteren Entwicklungsstadien gründlich untersucht. Im Gesamtbild waren homozygote Embryonen um E10.75 normal entwickelt, jedoch blass im Kopfbereich sowie in der dorsalen Rumpfregeion. Ihr Blut war nicht wie bei wildtypischen Embryonen homogen verteilt, sondern sammelte sich in Herzbeutel und Bauchhöhle an, was durch eine deutliche Rotfärbung sichtbar wurde (Abb. 10a, b; 11). Zusätzlich befand sich kein Blut in den Blutgefäßen des Dottersacks von Pkp2^{-/-}-Embryonen (Abb. 10c-f). Histologische Färbungen des Dottersacks und die PECAM-Immunantikörperfärbung zeigten jedoch, dass die Vaskulatur der Dottersäcke normal entwickelt und ausgebildet war (Abb. 10g, h). In homozygoten Embryonen war, wie in wildtypischen Embryonen, ein Blutgefäßnetzwerk mit Makro- und Mikrogefäßen vorhanden. Eine essentielle Rolle von Plakophilin 2 in der Angiogenese konnte damit ausgeschlossen werden. Das Erscheinungsbild der Embryonen sowie die Lokalisierung von Plakophilin 2 im Herz ließen

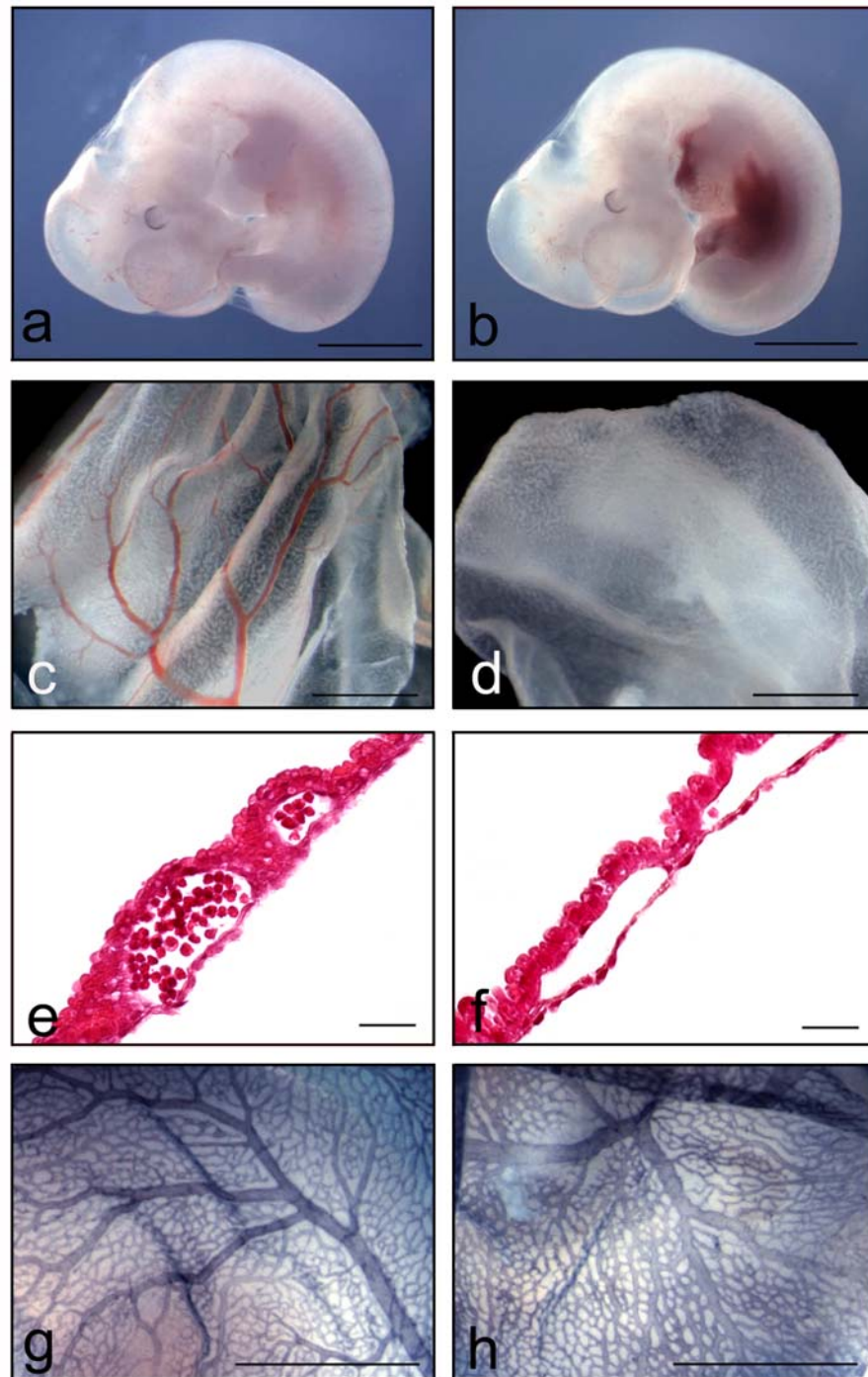


Abb. 10a-h: Phänotypen der Wt- und Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen E10.75. (a und b) Äußeres Erscheinungsbild von wildtypischen und homozygot-mutierten Embryonen mit Blutansammlung in der Perikardial- und Peritonealhöhle im homozygot-mutierten Embryo. (c-f) Makro- und Mikro-Vaskulatur des Dottersacks. Blutgefäße der wildtypischen, embryonalen Dottersäcke enthielten rote Blutkörperchen, während die Blutgefäße der homozygot-mutierten Pkp2-Dottersäcke keine Blutkörperchen enthielten. (c, d) Fotos von gesamten, frisch präparierten Dottersäcken, (e, f) Hämatoxylin/Eosin-gefärbte Schnitte von Dottersäcken. (g, h) Normal entwickelte Makro- und Mikro-Vaskulatur in einer PECAM-Färbung der Endothelzellen von Wt- und Pkp2^{-/-}-Dottersäcken. (a, c, e, g) Wildtyp, (b, d, f, h) Pkp2^{-/-}. 1000 µm (a, b, c, d, g und h), 100 µm (e und f).

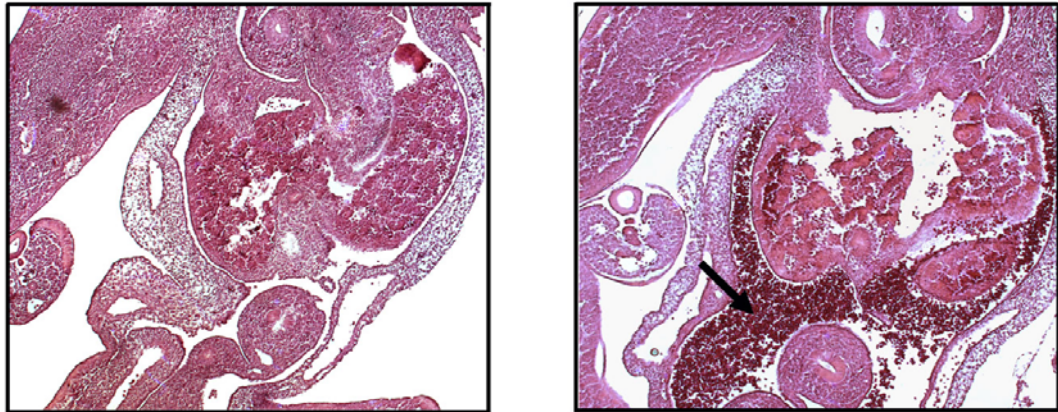


Abb. 11: Hämatoxylin/Eosin gefärbte Paraffinschnitte durch das Peritoneum von E10.75 Embryonen. Der Pfeil zeigt die Akkumulation von Blutzellen in der Bauchhöhle der Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen im Gegensatz zu Wildtyp-Embryonen. (links) Wildtyp, (rechts) Pkp2^{-/-}.

eine Rolle von PKP2 in der kardialen Entwicklung und Stabilität vermuten. Daher konzentrierten sich weitere Untersuchungen besonders auf die Analyse des Herzens. Transversale Eponschnitte durch das sich bildende embryonale Herz von Pkp2^{-/-}-Embryonen (E10.75) zeigten eine dünnere Trabekelschicht im zukünftigen linken und rechten Ventrikel des Herzens sowie dünnere Wände der Atrien im Vergleich zum Wildtyp¹⁵⁸ (Abb. 10i-l). In einigen Regionen der Atriumwände waren nur zwei Zellschichten im Gegensatz zu drei bis vier Zellschichten in Atriumwänden der Wildtypembryonen sichtbar. In der Proliferation und Apoptose der Kardiomyozyten wurden keine Unterschiede festgestellt, wie mit anti-Phospho-Histon-3-Färbung und TUNEL-Analysen untersucht werden konnte (Daten nicht gezeigt). Ein massiver Riss in der Herzwand, welcher zuvor in Plakoglobin-defizienten Embryonen beschrieben wurde, konnte in Pkp2^{-/-}-Embryonen nicht beobachtet werden. Es wurden jedoch feine potentielle Löcher in der Herzwand von Plakophilin 2-defizienten Embryonen detektiert, was vermuten ließ, dass der Blutfluss in das Perikard durch diese feinen Öffnungen in der Herzwand zustande kam. Ein solches potentielles Loch ist mit einer Pfeilspitze in Abb. 10 l versehen. Es wurden auch Embryonen früherer und späterer Stadien untersucht. Homozygote Embryonen früherer Stadien (E9.5-10) waren normal entwickelt und wiesen keinen Blutfluss in den Herzbeutel oder in die Bauchhöhle auf. Ältere Embryonen um E11.5-12 zeichneten sich zusätzlich zum unkontrollierten Blutfluss durch ein geschwollens Perikard und Peritoneum aus, bevor sie nekrotisch wurden (Daten nicht gezeigt).

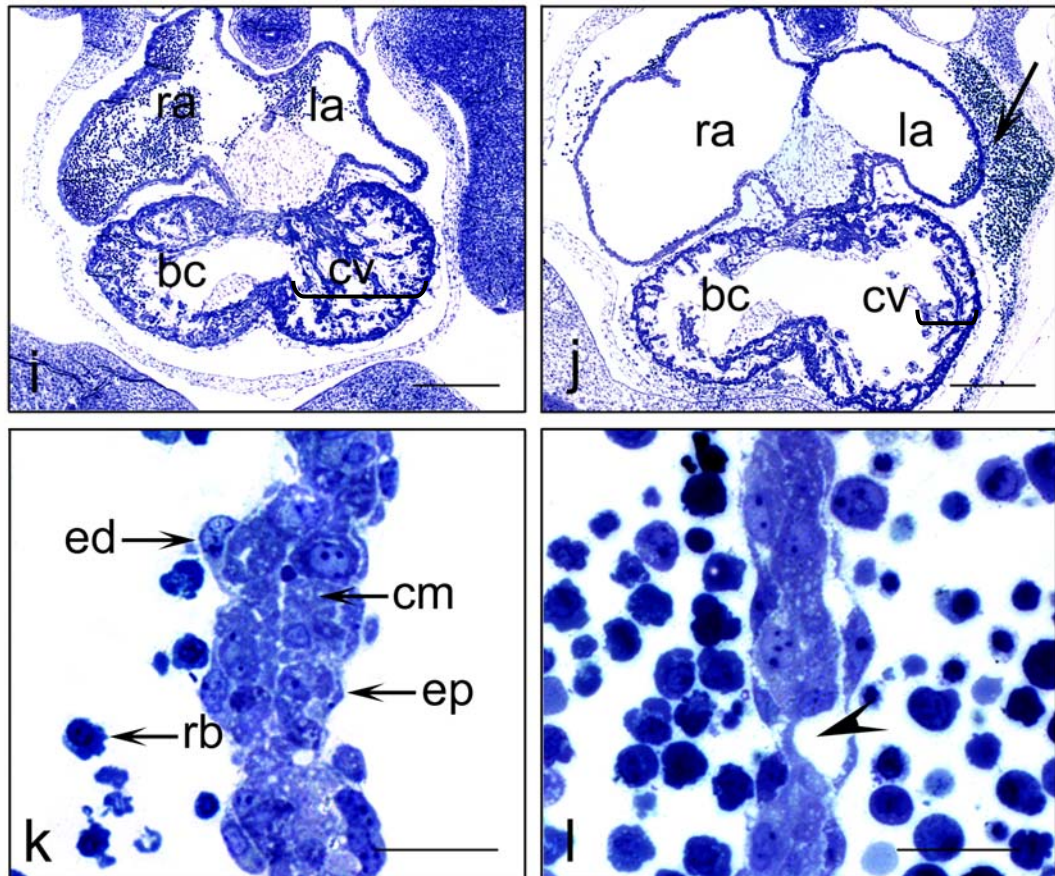


Abb. 10i-l: Phänotypen der Wt- (i, k) und Plakophilin 2^{-/-} (j, l) Embryonen E10.75. Lichtmikroskopie von Toluidinblau-gefärbten transversen Schnitten des embryonalen Herzens. Man beachte die verringerte Wanddicke der Atrien und die reduzierte Trabekelschicht des Ventrikels (Klammern) sowie die Blutakkumulation in der Perikardhöhle in Pkp2^{-/-}-Embryonen (Pfeil). ra und la, rechtes und linkes Atrium; bc und cv, bulbus cordis (zukünftiger rechter Ventrikel) und common ventricle (zukünftiger linker Ventrikel). (k, l) Vergrößerte Aufnahme der Atrienwände in wildtypischen und Pkp2^{-/-}-mutierten Herzen. (l) Dünner Atriumwände in mutierten Pkp2^{-/-}-Embryonen, die Position eines kleinen Loches in Pkp2^{-/-}-Herzen ist gekennzeichnet (Pfeilspitze). ed, Endokardiale Zellen; ep, Epikardiale Zellen; cm, Kardiomyocyten; rb, rote Blutzellen. Maßstäbe: 300 µm (i und j), 50 µm (k und l).

Veränderungen in der Zusammensetzung und Architektur der Zellverbindungen in den Glanzstreifen der Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen

Desmoplakin ist Hauptbestandteil und eine funktionell essentielle Komponente der Zellverbindungen des Herzens, welche Kardiomyozyten verbinden. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Laserscanmikroskopie können die Bestandteile der Zellverbindungen von wildtypischen- und Plakophilin 2^{-/-}-embryonalen Herzen markiert werden. Somit konnte die Lokalisierung von Zelladhäsionsproteinen und deren Kolokalisierung mit anderen Proteinen der

Zellverbindungen untersucht werden (Abb. 12A, B). In Herzen der Wildtypembryonen (E10.75) kolokalisierte Desmoplakin (DP, grüne Fluoreszenz) mit Zelladhäsionsmolekülen und den Armadillo-Proteinen Plakoglobin, β -Catenin und Plakophilin 2 sowie dem klassischen N-Cadherin und den desmosomalen Cadherinen Dsg 2 und Dsc 2 (rote Fluoreszenz), was durch übereinandergelagerte gelbe Fluoreszenz deutlich wurde (Abb. 12A).

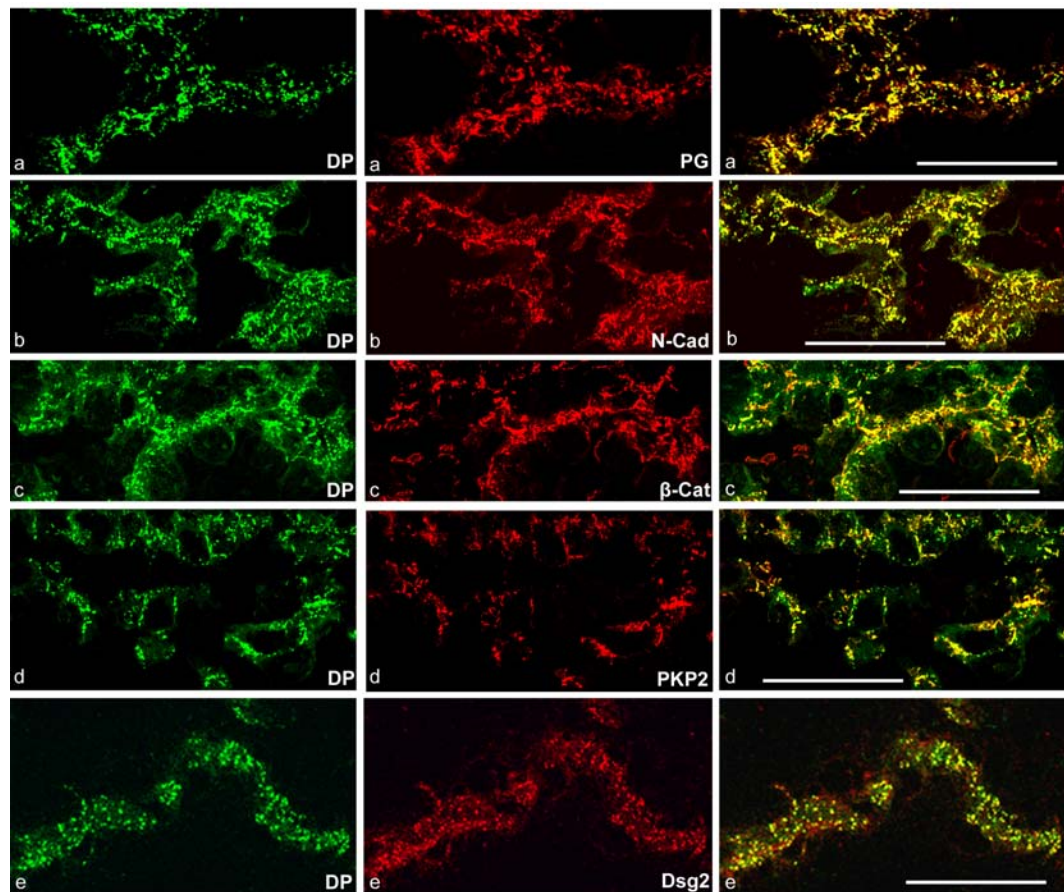


Abb. 12 A: Starke Unterschiede in der Komposition der Zellverbindungen der Glanzstreifen embryonaler E10.75 Pkp2^{-/-}-Herzen. Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von Kryostatschnitten kardialen Gewebes auf Wildtyp (Abb. 12 A) und Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen des Tages E10.75 (Abb. 12 B). Spezifische Antikörperkombinationen wurden angewandt: Kaninchen Antikörper gegen Desmoplakin (DP, markiert durch grüne Fluoreszenz) und murine monoklonale Antikörper gegen verschiedene andere Proteine kardialer Zellverbindungen (rote Fluoreszenz): (a and a') Plakoglobin (PG); (b and b') N-Cadherin (N-Cad); (c and c') β -Catenin (β -Cat); (d and d') Plakophilin 2 (PKP2); (e and e') Desmoglein 2 (Dsg2). Die überlagerten Fluoreszenzbilder sind in der rechten Kolumne dargestellt. (A) In Wildtyp-Embryonen zeigen die Zellverbindungen der Glanzstreifen eine weitreichende Kolokalisierung (gelb) von Desmoplakin mit (a) Plakoglobin, (b) N-Cadherin, (c) β -Catenin, (d) Plakophilin 2, und (e) Desmoglein 2. Andere bekannte Plaque-Proteine der kardialen Zellverbindungen zeigen identische Lokalisierungen, zu ihnen gehören p120catenin and α -Catenin (Daten nicht gezeigt). Maßstab, 50 μ m.

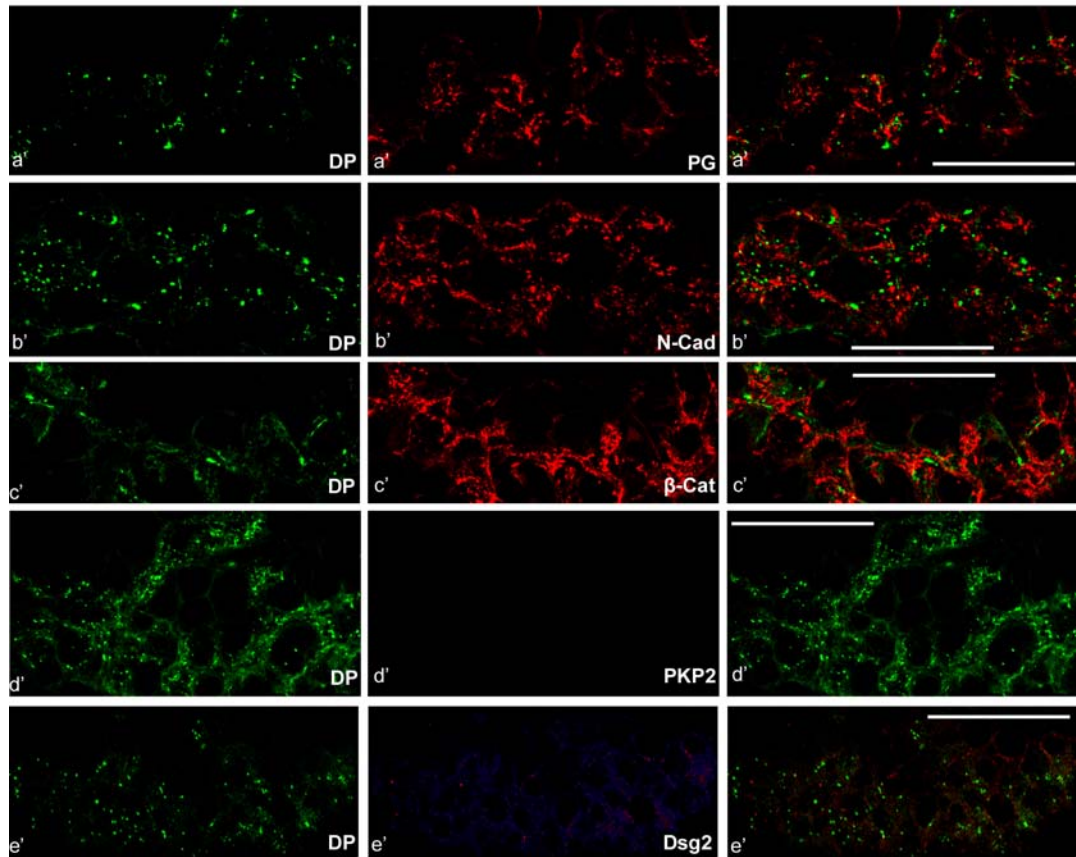


Abb. 12 B: Starke Unterschiede in der Komposition der Zellverbindungen der Glanzstreifen embryonaler E10.75 $Pkp2^{-/-}$ -Herzen. (B) Im Gegensatz zum Wildtyp kolokalisieren keine der Plaque-Proteine (PG, N-Cad, β -Cat, Dsg 2) mit Desmoplakin in $Pkp2^{-/-}$ -embryonalen Herzen (a'–e'). In diesen Mutanten ist Desmoplakin im Zytoplasma verteilt, und erscheint oft in einer Art granulärem Aggregat (grüne Punkte). (d') Vollständiger Verlust der Plakophilin 2-Immunfärbung in homozygot-mutierten Embryonen zeigt, dass tatsächlich eine Nullmutation generiert wurde. (e') Dsg2 ist nur schwach detektierbar in den Glanzstreifen von $Pkp2^{-/-}$ -Herzen. Maßstab, 50 μ m.

In starkem Kontrast dazu kolokalisierte Desmoplakin nicht mehr mit diesen Zelladhäsionsmolekülen in Zellverbindungen der Glanzstreifen Plakophilin 2-defizienter Embryonen (Abb. 12B). Das betraf beispielsweise die Armadillo-Proteine Plakoglobin und β -Catenin sowie das klassische N-Cadherin. Stattdessen war Desmoplakin hauptsächlich im Zytoplasma, abseits von den Zellverbindungen verteilt. Zusätzlich waren die desmosomalen Cadherine, Desmoglein 2 und Desmocollin 2, nur sehr gering in den Herzen der $Pkp2^{-/-}$ -Embryonen exprimiert, was durch eine sehr schwache rote Fluoreszenz im Vergleich zu Wildtypherzen deutlich wurde. Wie erwartet zeigte die Immunlokalisierungen außerdem den Verlust der Expression von Plakophilin 2 in homozygoten Herzen (Abb. 12B).

Um den Effekt genauer zu charakterisieren, wurden zusätzlich zu den immunhistologischen Untersuchungen ultrastrukturelle Analysen durchgeführt. Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen können die Glanzstreifen der Kardiomyozyten sichtbar gemacht und verschiedene Zellverbindungstypen morphologisch unterschieden werden. Während der gesamten Embryonalentwicklung des Herzens sind die Glanzstreifen reich an Adhärenz-Verbindungen und Desmosomen, was am Beispiel eines E10.75-embryonalen Wildtypherzens deutlich wurde. In wildtypischen Embryonen ist eine kontrastreiche Zellverbindung des desmosomalen Typs sichtbar (Abbildung 13a oben). Die darunterliegende, schwächer kontrastierte Zellverbindung ist eine Adhärenz-Verbindung (Abbildung 13a unten). In den Herzen der Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen waren diese beiden Morphotypen nicht zu unterscheiden, und kontrastreiche Desmosom-typische Zellverbindungen waren nicht sichtbar (Abb. 13b). Elektronenmikroskopie und Immungoldfärbungen der Wildtyp-Herzen zeigten, dass Desmoplakin an den Plaques dieser beiden Zellverbindungen sitzt, was frühere Beobachtungen in Bezug auf die Zusammensetzung der Zellverbindungen in den Glanzstreifen des Herzens bestätigt, in denen Desmoplakin nicht nur an Desmosomen lokalisiert¹³⁹ (Abb. 13c, e). Obwohl eine stärkere Markierung in den Desmosom-typischen Zellverbindungen deutlich wurde, waren auch Adhärenz-ähnliche Verbindungen mit Desmoplakin gefärbt (Abb. 13e, man vergleiche die rechte Desmosom-Zellverbindung mit der linken Adhärenz-Verbindung). Zellverbindungen mit kontinuierlicher Markierung für Desmoplakin und Plakophilin 2 wurden ebenfalls häufig gefunden (Abb. 13g, h). Die Zellverbindungen waren auch für das transmembrane Glykoprotein N-Cadherin positiv gefärbt (Abb. 13k). In starkem Kontrast dazu war die Desmoplakin-Färbung in Herzen der Pkp2^{-/-}-Embryonen drastisch verändert. Die Immungoldfärbung zeigte den Verlust von Desmoplakin an den Glanzstreifen (Abb. 13d, f, i, j). Desmoplakin war stattdessen im Zytoplasma zu finden, häufig in Form von dichten Aggregaten mit einer Größe von bis zu 1 µm (Abb. 13i und j). Diese Aggregate waren oft mit Intermediärfilamentbündeln assoziiert. An vielen Stellen waren Intermediärfilamente durch die Desmoplakinaggregate misorientiert, was bei stärkerer Vergrößerung sichtbar wurde (Abb. 14). Intermediärfilamente waren häufig in Form von ungeordneten, locker arrangierten Schlingen

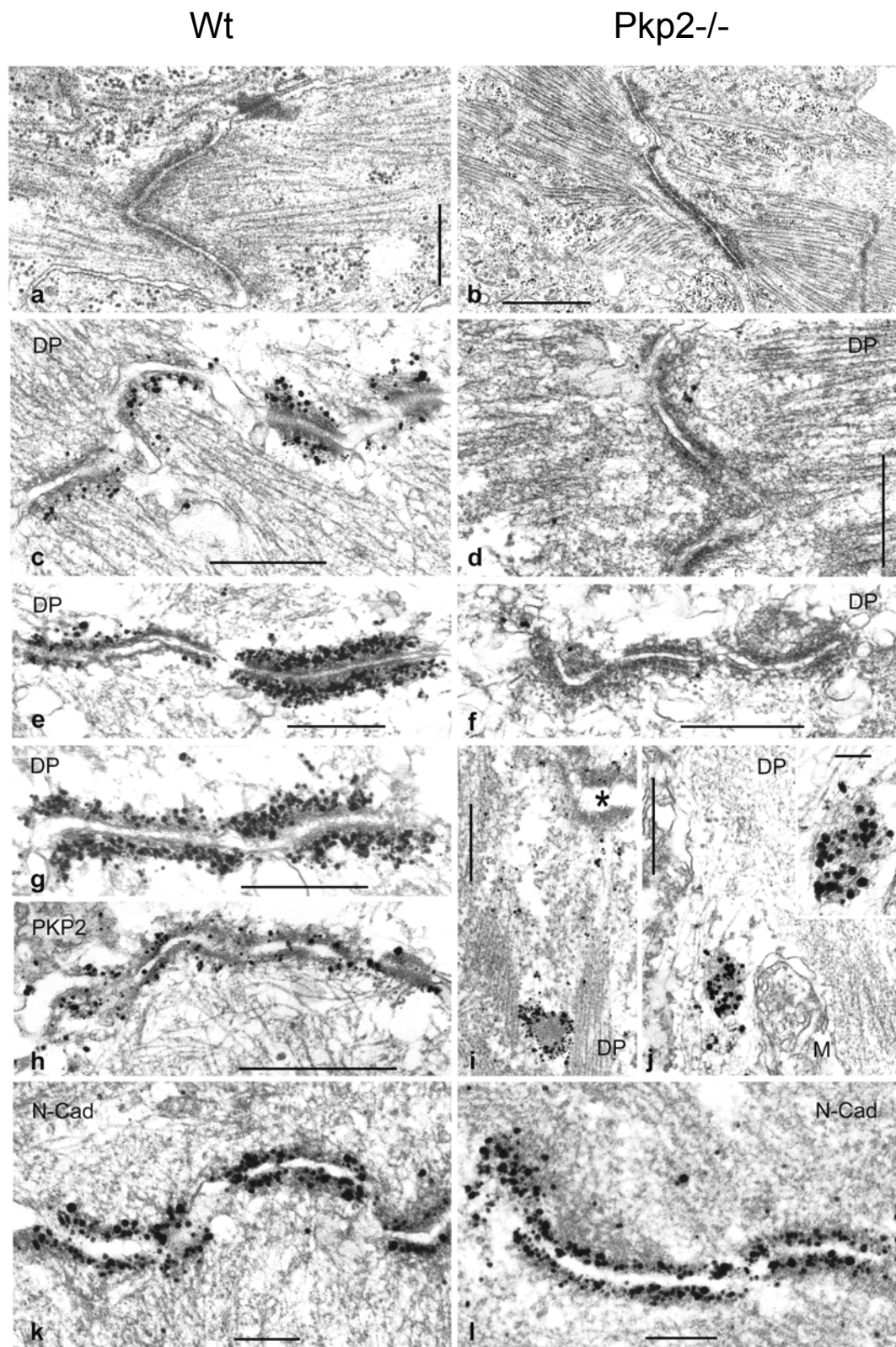


Abb. 13 a-l: Die Abwesenheit von Plakophilin 2 führt zur Ablösung von Desmoplakin von den Glanzstreifen der Herzen (*area composita*). Elektronen- (a und b) sowie Immunelektronen- (c-l) Mikroskopie ultradünner Schnitte durch Glanzstreifen embryonaler Herzen von Wildtyp und *Pkp2*^{-/-}-Embryonen (E10.75). Desmosomen, wie im Wildtyp, im oberen Teil von Abbildung (a) sichtbar, waren in *Pkp2*^{-/-}-Herzen (b) nicht vorhanden. Die elektronenmikroskopische Erscheinung von Adhärenz-Verbindungen jedoch war in homozygot-mutierten Herzen ähnlich zu wildtypischen

Herzen (unterer Teil von Abbildung a und b). Die Lokalisierung von Desmoplakin war in $Pkp2^{-/-}$ -Herzen im Vergleich zu Wildtyp-Herzen drastisch verändert. In wildtypischen Herzen war Desmoplakin stark an den Plaques beider Morphotypen zu finden (c und e), obwohl in der Regel eine stärkere Färbung an Desmosomen deutlich wurde (in Abbildung e, vergleiche die rechte Desmosomen-Zellverbindung mit der linken Adhärenz-Verbindung) waren auch Adhärenz-ähnliche Verbindungen positiv für Desmoplakin (c, e, g). Diese Art von Zellverbindungen waren auch positiv für Plakophilin 2 (h). Im Gegensatz dazu war in $Pkp2^{-/-}$ -Herzen keine Desmoplakin-Färbung an den Glanzstreifen detektierbar (d, f). Stattdessen war Desmoplakin teilweise im Zytoplasma verteilt und oft in dichten Aggregaten entfernt von den Glanzstreifen zu finden (i, j). Andere Bestandteile der Zellverbindungen des Herzens, wie das klassische Cadherin (N-Cadherin) waren in vergleichbarer Intensität an den Glanzstreifen der $Pkp2^{-/-}$ wie auch wildtypischen Herzen detektierbar. Maßstäbe, 1 μm (b), 0.5 μm (a, c- g, i, j), 0.2 μm (h, k, l), 0.1 μm (j, Ausschnitt).

um Desmoplakinaggregate zu sehen. Andere Zelladhäsionsproteine, wie das klassische N-Cadherin sowie β -Catenin, beide typisch für Adhärenz-Verbindungen, waren in Plakophilin $2^{-/-}$ -Embryonen im Vergleich zum Wildtyp normal an den Glanzstreifen des Herzmuskels lokalisiert (Abb. 13k, l). In den Abbildungen wird zusätzlich deutlich, dass das Aktin/Myosin-Zytoskelett vom Verlust der Plakophilin 2-Expression nicht sichtbar betroffen war, in wildtypischen wie auch in $Pkp2^{-/-}$ -Embryonen führten die Mikrofilamente zu den Zellverbindungen der Glanzstreifen (Abb. 13a und b). Somit ist die Funktion des kontraktilen Apparates durch die $Pkp2$ -Mutation nicht beeinträchtigt, was durch vorhandenen Herzschlag der $Pkp2^{-/-}$ -Embryonen unterstrichen wurde. Die in Plakophilin 2-defizienten Embryonen fehlende Verankerung der Intermediärfilamente mit den Glanzstreifen führte jedoch zu verminderter Zelladhäsion und Stabilität der Kardiomyozyten.

In epithelialen Geweben, wie der Epidermis (Abb. 15a, b) und der Magenschleimhaut (Abb. 15c- e), war die Ultrastruktur der Zellverbindungen in Plakophilin $2^{-/-}$ -Embryonen beachtlicherweise nicht verändert. In Wildtypen sowie in homozygot-mutierten Embryonen waren in entsprechenden Geweben typische Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen sichtbar. Gleichfalls konnten keine morphologischen Unterschiede in Zellverbindungen der Aorta sowie in Endothelzellen kleinerer Blutgefäße gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

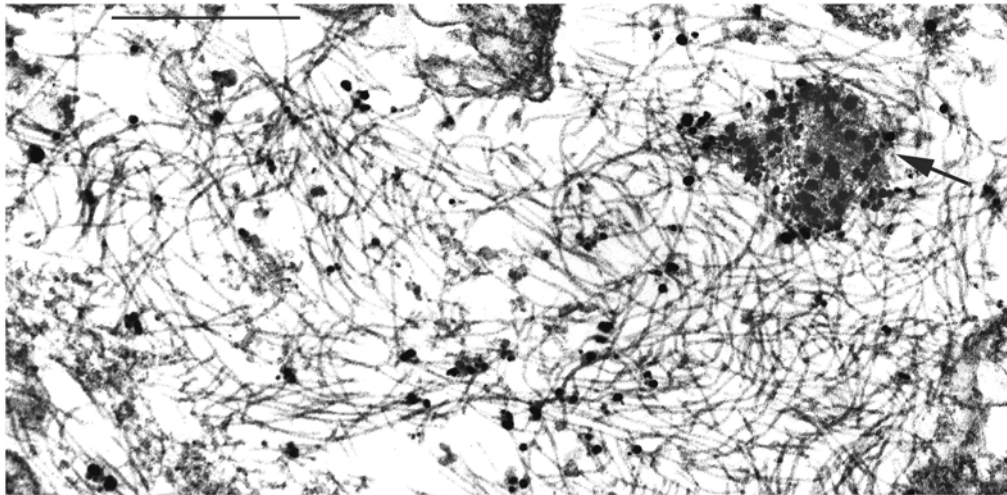


Abb. 14: Intermediärfilamente (IF) um ein Desmoplakinaggregat in einer Herzmuskelzelle von Plakophilin 2-defizienten E10.75-Embryonen. Die immunelektronische Abbildung eines Ultradünnschnittes zeigt ein typisches dichtes, granuläres Aggregat (Pfeil), in welchem Desmoplakin von extensiven Schlingen aus ungeordneten Intermediärfilamenten umgeben ist. Die Desmoplakin-Immungoldfärbung ist nicht nur im Aggregat, sondern auch über die gesamten IF-Schlingen verteilt zu sehen. Maßstab, 0,5 μm .

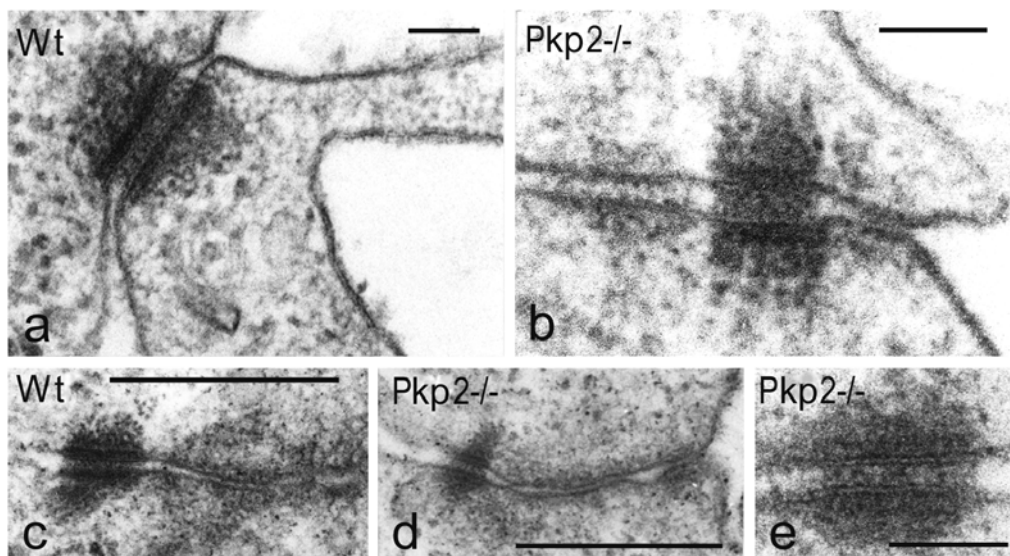


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit normaler Morphologie von Zellverbindungen epithelialer Gewebe um E10.75 in Wildtyp und Plakophilin 2-defizienten Embryonen. (a und b) In der sich entwickelnden Epidermis von Wt- (a) und Pkp2^{-/-}- (b) Embryonen waren Desmosomen mit ähnlicher Ultrastruktur sichtbar. Sie waren häufig in der Nähe kleiner Adhärenz-Verbindungen zu finden (z.B. links vom Desmosom in Abbildung b). (c, Wt; d und e Pkp2^{-/-}). Ähnlich dazu lagen in anderen Epithelien Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen nebeneinander, wie z.B. in der Magenschleimhaut. (e) Die vergrößerte Aufnahme zeigt eine normale Plaquedicke und -dichte sowie eine normale Erscheinung der Desmoglea und dem inneren und äußeren Plaque in Plakophilin 2-defizienten Epithelien. Maßstäbe, 0,1 μm (a, b, e), 0,5 μm (c, d).

Biochemische Unterschiede in Zellverbindungen embryonaler Herzen

In Geweben sowie einschichtigen Zellkulturen epithelialer Zellen und Kardiomyozyten sind Zelladhäsionsproteine, wie beispielsweise die Plakophiline, zu einem Großteil mit dem Zytoskelett assoziiert. Wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde, sind diese Strukturproteine durch ihre Verbindung mit dem Zytoskelett und ihre enge Assoziation innerhalb einer Zellverbindung in nichtdenaturierenden Detergenzien wie Triton X-100 und NP-40 zu einem Großteil unlöslich^{1,48,103,104}. Um die Zusammensetzung der Zelladhäsionskomplexe in wildtypischen und homozygoten Herzen zu untersuchen, wurden diese mit TritonX-100-Lysepuffer behandelt und in lösliche und unlösliche Komplexe getrennt. Wie erwartet wurden in E10.75-Wildtyp-Herzlysaten große Anteile der Zelladhäsionsproteine Desmoplakin, Plakoglobin, β -Catenin und Plakophilin 2 sowie der desmosomalen Cadherine Desmoglein 2 und Desmocollin 2 als auch das klassische Cadherins N-Cadherin in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion detektiert (Abb. 16).

Im Gegensatz dazu waren in Plakophilin 2-defizienten Herzen Desmoplakin und zum Teil auch Plakoglobin viel stärker in der löslichen Fraktion vertreten (d.h. sie sind weniger stark mit dem Zytoskelett und Zellverbindungskomplex assoziiert), während die Löslichkeit von typischen Adhärenz-Verbindungs-Proteinen wie N-Cadherin und β -Catenin unverändert blieb (Abb. 16). Außerdem wurden im Vergleich zum Wildtyp nur sehr geringe Mengen an desmosomalen Cadherinen Dsg2 und Dsc2 in Plakophilin 2-defizienten Herzen detektiert. In Übereinstimmung mit unseren vorherigen Befunden folgern wir aus diesen Ergebnissen, dass die Assoziation von Desmoplakin und Plakoglobin sowie der desmosomalen Cadherine mit dem Zelladhäsionskomplex in $Pkp2^{-/-}$ -Kardiomyozyten stark eingeschränkt ist. Dies geht einher mit der reduzierten Stabilität der Glanzstreifen embryonaler Herzen.

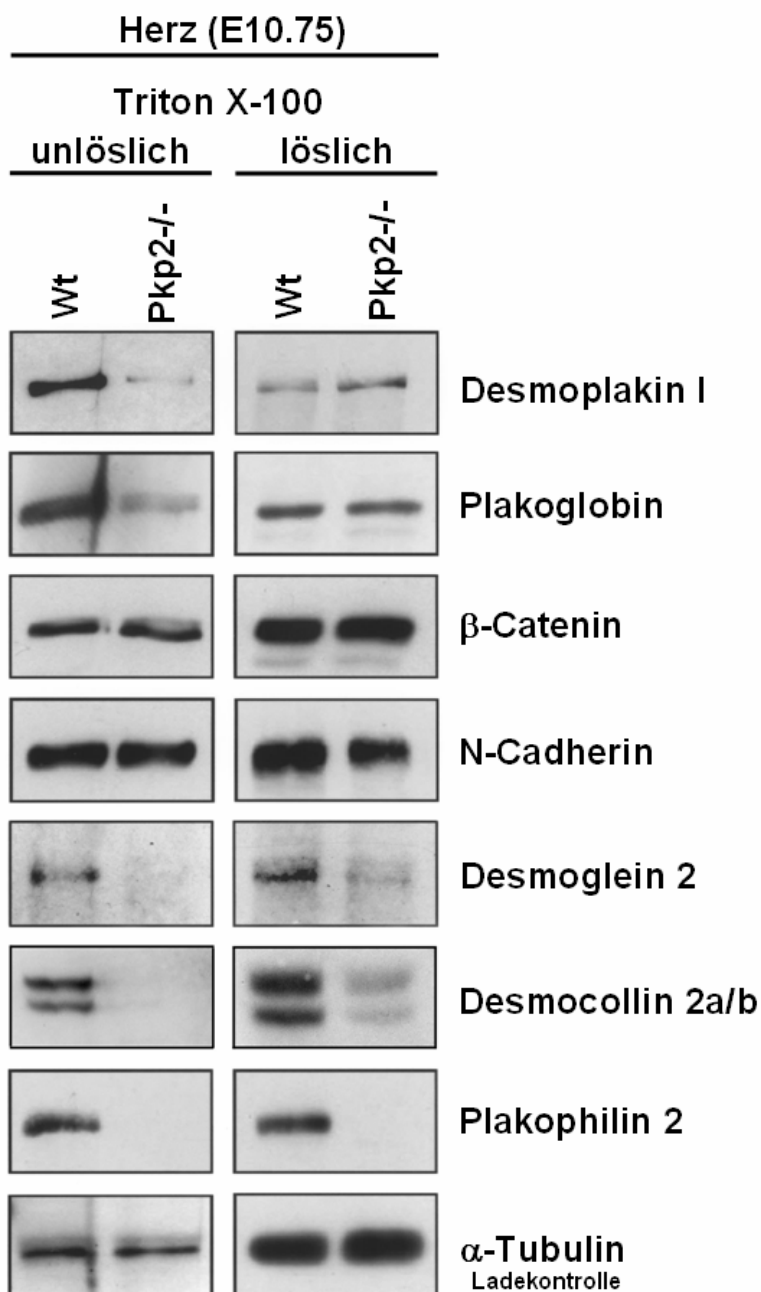


Abb. 16: Triton X-100-Extrahierbarkeit der Zellverbindungsproteine in Herzen von Wildtyp und Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen um E10.75. Triton X-100-unlösliche und -lösliche Fraktionen embryonaler Herzen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die relativen Mengen spezifischer Proteine wurden durch Immundetektion mit Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. In Pkp2^{-/-}-Herzen war der Großteil von Desmoplakin und auch ein Teil von Plakoglobin nicht mehr in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion detektierbar. Desmosomale Cadherine wie Dsg2 und Dsc2a/b waren in Plakophilin 2^{-/-}-Herzen nur in sehr geringen Mengen in der Triton X-100-löslichen Fraktion zu finden, während die Expression und Löslichkeit typischer Proteine aus Adhärenz-Verbindungen, wie N-Cadherin und β -Catenin, unverändert blieben.

Reduzierte Proteinstabilität der desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2a/b in Pkp2^{-/-}-Herzen

Im zuvor erläuterten Versuch habe ich eine deutliche Reduktion der Proteinmenge von Desmoglein 2 und Desmocollin 2a/2b beschrieben. Um zu untersuchen, ob diese Reduktion auf RNA- oder Proteinebene stattfand, wurde eine semiquantitative Real-Time-PCR für Desmoglein 2, Desmocollin 2a/b und α -Tubulin (als Kontrolle) mit RNA aus embryonalen Herzen durchgeführt (Abb. 17). Für Desmocollin 2 korrespondiert die obere der Doppelbanden mit der längeren Spleißvariante Dsc 2a und die untere Bande mit der kürzeren Spleißvariante Dsc 2b. Es sind keine Unterschiede in der Signalstärke zwischen wildtypischen Herzen und Pkp2^{-/-}-Herzen in Desmoglein 2 und Desmocollin 2a/b nach unterschiedlichen Zyklenzahlen zu sehen (Abb. 17). Die Ergebnisse zeigen, dass in Plakophilin 2-defizienten Herzen die verringerte Expression der desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Die niedrige Expression dieser Proteine in Pkp2^{-/-}-Herzen wird daher höchstwahrscheinlich auf eine verminderte Proteinstabilität zurückzuführen sein.

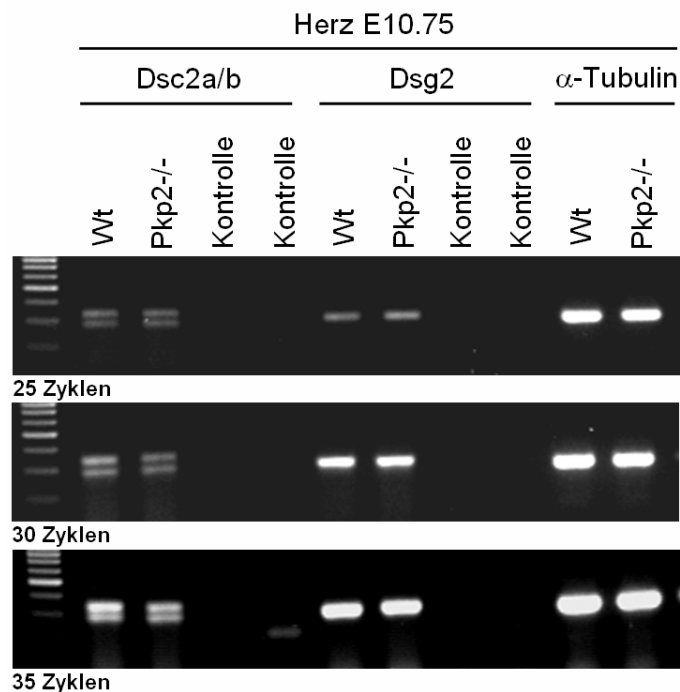


Abb. 17: Semiquantitative RT-PCR von Wildtyp- und Plakophilin 2^{-/-}-embryonalen Herzen E10.75. Spezifische Primer für Desmocollin 2a und 2b sowie Desmoglein 2 und α -Tubulin wurden für die semiquantitative RT-PCR verwendet. In den Kontrollen wurde für die cDNA-Synthese-Reaktion keine RT-Polymerase zugefügt. Kontroll-PCRs wurden für jedes Primerpaar für Wt und Pkp2^{-/-}-Herzen durchgeführt, die jeweils erste Kontrollspur entspricht der PCR-Reaktion für wildtypische

Herzen, die jeweils zweite Kontrollspur entspricht der Kontroll-Reaktion für Pkp2^{-/-}-Herzen. PCR-Reaktionen wurden nach 25, 30 und 35 Zyklen gestoppt und elektrophoretisch aufgetrennt.

Mutationen in Plakophilin 2 sind häufig in Arrhythmogener-Rechts-Ventrikulärer-Kardiomyopathie

Aufgrund der Plakophilin 2-Nullmutation in der Maus, welche zu letalen Veränderungen im Herzen führt, sollte desweiteren untersucht werden, ob Mutationen im Gen für Plakophilin 2 beim Menschen für Arrhythmogene-Rechts-Ventrikuläre-Kardiomyopathie (ARVC) verantwortlich sind. Aus diesem Grund führte die Arbeitsgruppe von L. Thierfelder in einer Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe Sequenzanalysen von allen 14 Exonen und Exon/Intron-Grenzen des humanen Plakophilin 2-Gens von 120 nicht miteinander verwandten ARVC-Patienten (101 Männer, 19 Frauen) durch. Tatsächlich wurden in dieser Sequenzanalyse bei 32 von 120 Patienten (27 Männer, 5 Frauen) 25 verschiedene heterozygote Mutationen im Plakophilin 2-Gen identifiziert. Die Mehrheit der gefundenen Mutationen (18 der 25 Mutationen) führt zu STOP-Kodons (Abb. 18). Die Mutationen beinhalten Basenaustausche, die zu einem direkten STOP-Kodon führen, Leserasterverschiebungen durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden, Spleißstellenmutationen und Fehl-Sinn-Mutationen (Abb. 18). Obwohl die meisten Mutationen in der C-terminalen Hälfte des Moleküls gefunden wurden, verteilten sich die Mutationen über das ganze offene Leseraster. Sechs unabhängige Ereignisse derselben Nicht-Sinn-Mutation (235C→T), die zu einem direkten STOP-Kodon führen, ließen vermuten, dass Nukleotid 235 einen „Hot-Spot“ für Mutationen im Plakophilin 2-Gen darstellt. Keine der 25 PKP2-Mutationen wurde in 250 untersuchten Kontrollen gefunden. Zwei Familien, A100 und EPF, wurden systematisch analysiert. Die Familie EPF trägt die Insertionsmutation 216insG, die Mitglieder der Familie A100 weisen eine Deletionsmutation (2076_2077delAA) auf (Abb. 19). Diese Deletionsmutation wurde in zwei von ARVC betroffenen Patienten (18 und 161) der Familie A100 detektiert. Vier weitere Familienmitglieder tragen ebenfalls die Mutation, haben jedoch einen unbetroffenen oder bislang ungeklärten Krankheitsstatus (Abb. 19). Zwei Mitglieder (11 und 12) der anderen Familie (EPF) mit ARVC starben plötzlich im Alter von 15 und 16 Jahren. Eine Autopsie zeigte, dass beide Personen an ARVC erkrankt waren, während von fünf weiteren Familienmitgliedern mit derselben Mutation nur einer (17) ARVC-Merkmale aufwies (Abb. 19).

Plakophilin 2-Mutationen in 32 von 120 ARVC-Patienten

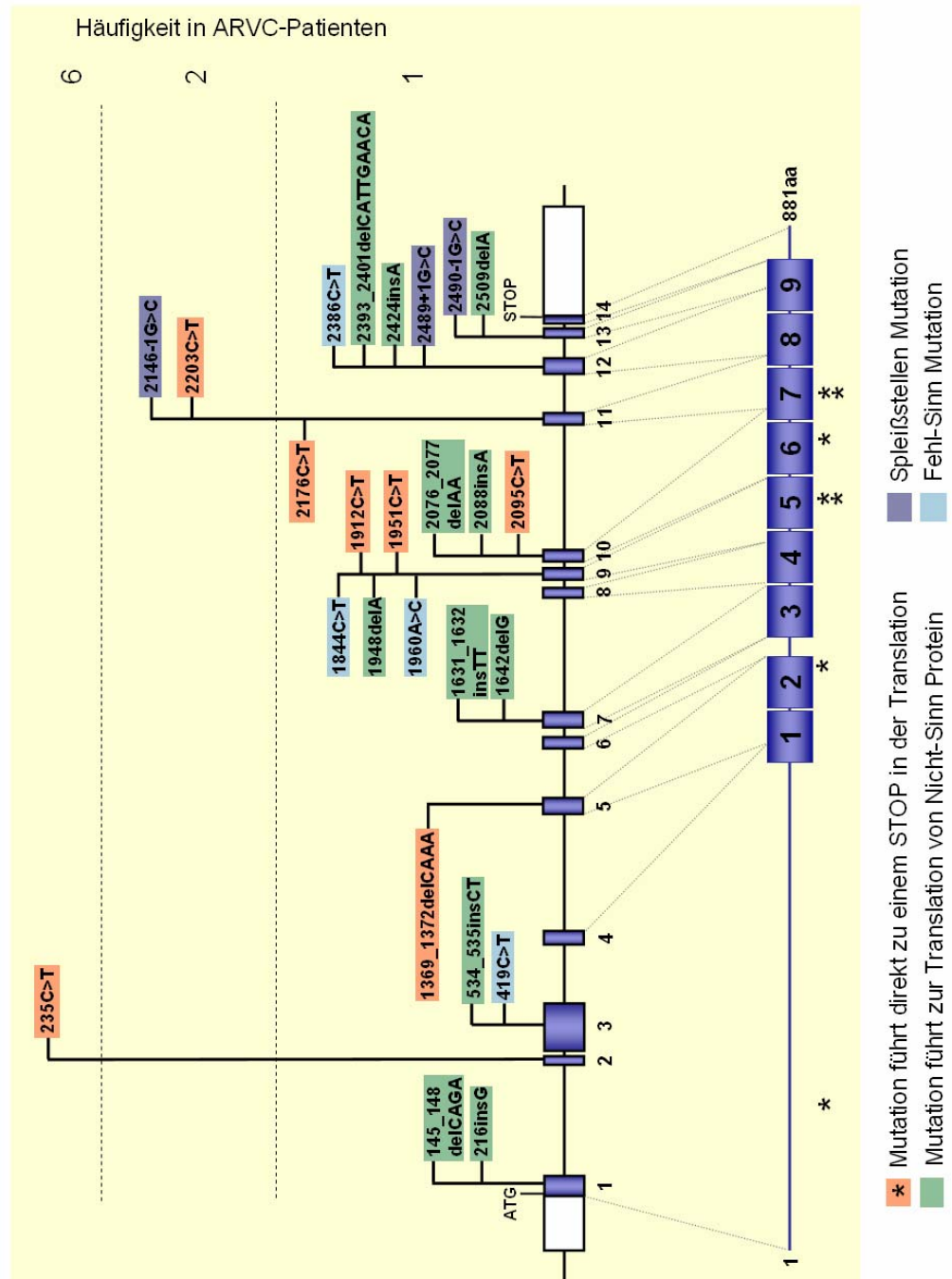


Abb. 18: Genomische Struktur und die Protein-Struktur von Plakophilin 2 mit ARVC assoziierten Mutationen. Das humane Gen für Plakophilin 2 hat 14 Exone, die Nummerierung der Nukleotide beginnt beim ATG und bezieht sich auf die Genbank-Zugriffsnummer X97675. Gestrichelte Linien begrenzen die Bereiche des Proteins, die von entsprechenden Exonen kodiert werden. Die Positionen der 25 gefundenen Mutationen in ARVC-Patienten sind anhand der genomischen Sequenz dargestellt. Mutationen, die zu einem STOP-Kodon führen sind rot, Leserasterverschiebungen grün, Spleißstellenmutationen dunkelblau und Fehlsinn-Mutationen hellblau unterlegt. Die Häufigkeit der Mutationen (insgesamt 32 von 120) ist durch die Y-Achse gekennzeichnet. aa, Aminosäuren. Modifiziert nach¹⁵⁹.

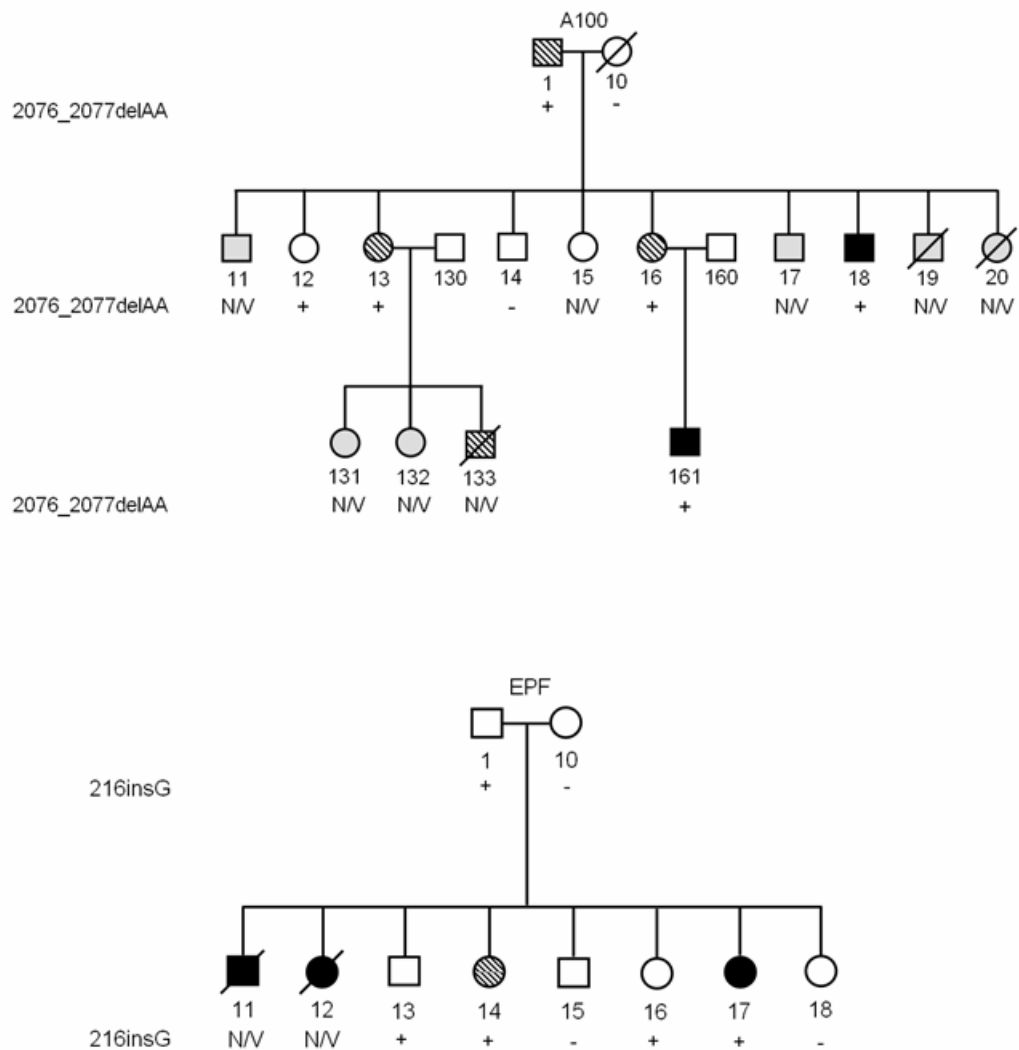


Abb. 19: Stammbäume der Familien A100 und EPF mit Plakophilin 2 Mutationen und ARVC. ARVC Patienten sind schwarz, von ARVC unbetroffene Personen sind weiss dargestellt. Ein ungeklärter Krankheitsstatus ist mit gestrichelt und ein unbekannter Krankheitsstatus mit grau markiert. (+) bedeutet Vorhandensein oder (-) nicht Vorhandensein der PKP2-Mutation, N/V bedeutet, dass Personen nicht für genetische Analysen verfügbar waren. Schrägstrich bedeutet verstorben; Quadrat, männlich; Kreis, weiblich. Abbildung modifiziert nach¹⁵⁹.

Um die Auswirkungen der Mutationen auf Proteinebene zu untersuchen und Rückschlüsse auf die Variabilität der Phänotypenausprägung sowie den Krankheitsmechanismus zu ziehen, habe ich Western-Blot-Analysen durchgeführt. Von der Familie A100 mit der 2-bp-Deletionsmutation im Exon 10 des PKP2-Gens konnte eine Rechts-Herzbiopsie eines Patienten A100/161 für eine Western-Blot-Analyse genutzt werden. Die Mutation verursacht eine Leserasterverschiebung und würde nach 693 Aminosäuren zur Translation von 48 Nicht-Sinn-Aminosäuren führen, bis es nach 741 Aminosäuren zu einem STOP-

Kodon kommt. Das Ergebnis einer Western-Blot-Analyse eines Patienten der A100-Familie mit dieser Deletionsmutation im Cystein 693 (in der sechsten Arm-Wiederholung), zeigte jedoch kein erwartetes trunkiertes Protein von 83 kDa, sondern eine reduzierte Menge des Wildtypproteins (Abb. 20).

Wie im untersuchten ARVC-Patienten (2076_2077delAA), sind die PKP2-mRNA- und Proteinmengen aus Pkp2^{+/-}-Mäusen ebenfalls reduziert (Abb. 21). Es wäre daher interessant, adulte Mäuse auf einen ARVC-Phänotyp zu untersuchen und ein Mausmodell zum besseren Verständnis der Krankheit zu etablieren.

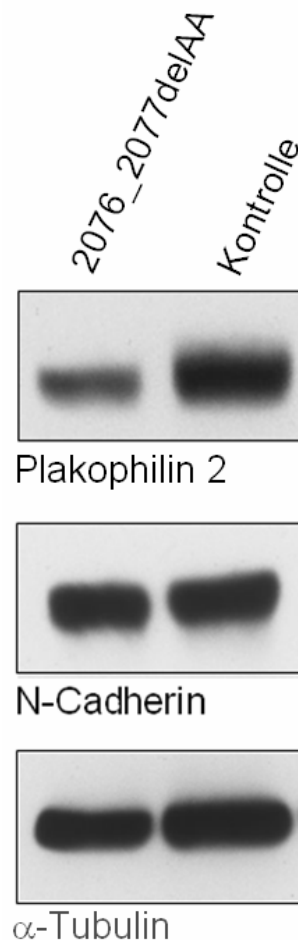


Abb. 20: Western-Blot einer Herzbiopsie eines ARVC-Patienten mit der Mutation 2076_2077delAA. Die Western-Blot-Analyse stammt von einer Herzbiopsie des rechten Ventrikels eines ARVC-Patienten mit einer Leserasterverschiebungs-Mutation, die zu einem vorzeitigen STOP-Kodon nach 741 Aminosäuren führt. Mit verschiedenen Antikörpern gegen Plakophilin 2 konnte kein verkürztes Protein von 83 kDa detektiert werden (ein anti-Head-Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 131-148 und sollte somit ein verkürztes Protein erkennen). Das Ergebnis zeigt jedoch eine reduzierte Menge des Wildtyp-PKP2-Proteins im Vergleich zum Kontrolllysat einer rechten Herzbiopsie eines Patienten ohne ARVC und ohne Plakophilin 2-Mutation. N-Cadherin und α -Tubulin dienten als Ladekontrollen.

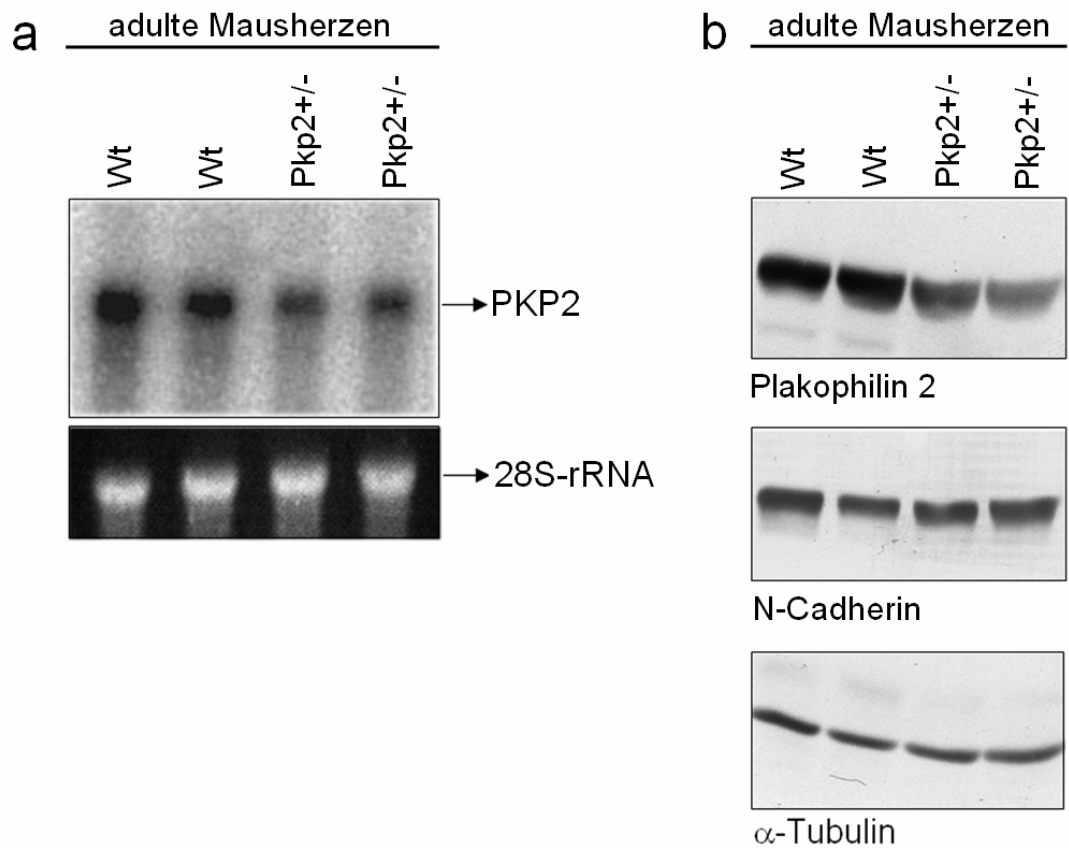


Abb. 21: Northern-Blot- und Western-Blot-Analyse von adulten Herzen aus Wildtyp- und Plakophilin 2^{+/-}- Stämmen. (a) Northern-Blot-Analyse von jeweils zwei wildtypischen (+/+) und für Plakophilin 2-heterozygoten (+/-) adulten Herzproben. Eine C-terminale Sonde gegen die mRNA von Plakophilin 2 zeigte reduzierte Signale in heterozygot-mutierten Herzen im Vergleich zu wildtypischen Herzen. Die 28S-rRNA des Ethidiumbromid-gefärbten RNA-Gels diente als Ladekontrolle. (b) Western-Blot-Untersuchungen von Herzproben aus jeweils zwei adulten Wildtyp- und Pkp2^{+/-}-Mäusen zeigten ebenfalls reduzierte Plakophilin 2-Proteinmengen in Pkp2^{+/-}-Herzen im Gegensatz zu wildtypischen Herzen. Immundetektionen von N-Cadherin und α-Tubulin dienten als Ladekontrollen.

Diskussion

Plakophilin 2 ist essentiell für die Organisation kardialer Zellverbindungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Nullmutation im Plakophilin 2-Gen in der Maus zu letalwirkenden Veränderungen des Herzens während der Embryonalentwicklung führt. Defekte Zelladhäsion in den Glanzstreifen des Herzmuskels äußert sich durch Blutfluss in das Perikard. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und biochemische Ergebnisse konnten stark reduzierte Assoziationen der Proteine Desmoplakin und Plakoglobin mit den anderen Zelladhäsionsproteinen an den Glanzstreifen sowie verminderte Expression desmosomaler Cadherine Dsg2 und Dsc2a/b demonstrieren. Desmosom-typische Zelladhäsionskomplexe werden in Pkp2^{-/-}-Herzen nicht gebildet. Plakophilin 2 erweist sich somit als ein essentielles Protein in der Organisation der kardialen Zellverbindungen während der Embryogenese. Der Fakt, dass Plakophilin 2 das einzige Plakophilin ist, welches in den Zellverbindungen des Myokards exprimiert wird, unterstreicht die außerordentliche Sensibilität dieser mutierten Herzen.

Veränderungen desmosomaler Komplexe in den Glanzstreifen des Herzens

Der Verlust von Plakophilin 2 beeinträchtigt die Bildung desmosomaler Zelladhäsionskomplexe und deren Assoziation mit den Intermediärfilamenten, jedoch nicht die Bildung von typischen Adhärenz-Verbindungen und deren Assoziation mit den Aktin/Myosinfilamenten. Die Intermediärfilamente sind in Plakophilin 2^{-/-}-Herzen fehllokalisiert, d.h. unorganisiert im Zytoplasma verteilt und nicht mehr mit den Glanzstreifen verbunden. Häufig haftet das Intermediärfilament-Netzwerk schlingenförmig an Desmoplakin-Aggregaten im Zytoplasma an (schematisch Abb. 22). Die Assoziation zwischen Desmoplakin und Intermediärfilamenten abseits der Zellmembran spiegelt, übereinstimmend mit Ergebnissen aus Epithelzellen, das bekannte Bindungsverhalten dieser beiden Proteine wider^{48,94,96,101,103,105,160}. Im Gegensatz dazu sind in Plakophilin 2-defizienten Herzen die Myofibrillen unverändert mit den Glanzstreifen der Kardiomyozyten assoziiert. Daraus folgt, dass Plakophilin 2 und Desmoplakin zwar wichtig für die Verankerung der Intermediärfilamente sind, jedoch

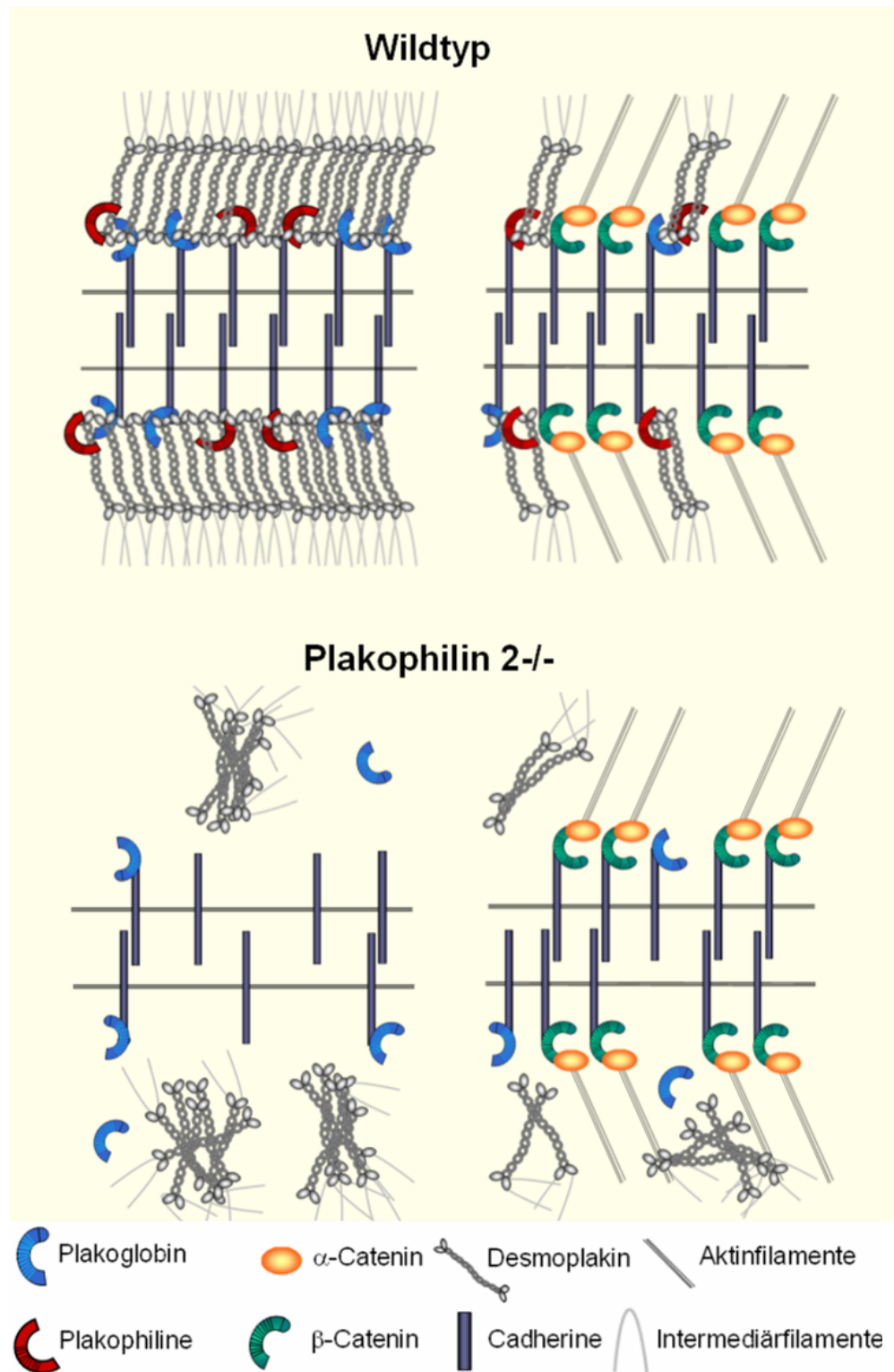


Abb. 22: Schematische Darstellung von Zellverbindungen der Glanzstreifen des Herzens. In den Glanzstreifen des Herzens befinden sich verschiedene Arten von Zellverbindungen; typische Desmosomen (links in beiden Abbildungen), reine Adhärenz-Verbindungen (nicht dargestellt) und intermediäre Zellverbindungen, die morphologisch ähnlich zu Adhärenz-Verbindungen aussehen, aber positiv für Desmoplakin sind (rechts in den Abbildungen dargestellt). Der Verlust von Plakophilin 2 führt zum Ablösen von Desmoplakin und teilweise Plakoglobin aus den Zellverbindungen. Desmoplakin bildet Aggregate im Zytoplasma, die mit dem Intermediär-

filament-Zytoskelett assoziiert sind. Die Expression der desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 ist außerdem reduziert. Typische Proteine aus Adhärenz-Verbindungen wie z.B. N-Cadherin und β -Catenin sind unverändert in den Glanzstreifen der Pkp2^{-/-}-Herzen lokalisiert.

nicht unbedingt notwendig für die Verankerung der Myofibrillen. Immunlokalisierung und biochemische Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass in Plakophilin 2-defizienten Embryonen die Armadillo-Proteine β -Catenin sowie ein Teil von Plakoglobin, mit den Zellverbindungen der Glanzstreifen assoziiert bleiben (Abb. 22, schematisch). Daher ist deren Bindung an andere Zellverbindungskomponenten, zum Beispiel an das klassische N-Cadherin ausreichend, um eine Assoziation mit dem Zelladhäsionskomplex zu gewährleisten. Plakophilin 2 ist demnach nicht notwendig für die Assoziation von typischen Armadillo-Proteinen der Adhärenz-Verbindungen mit den Glanzstreifen¹⁰¹. Die desmosomalen Cadherine Desmoglein 2 und Desmocollin 2 waren größtenteils in der Detergenz-löslichen Fraktion der mutierten Herzen zu finden und außerdem nur in geringen Mengen detektierbar (Abb. 16). Basierend auf Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCR (Abb. 17) ist die schwache Expression der desmosomalen Cadherine nicht auf reduzierte mRNA sondern auf verminderte Proteinstabilität zurückzuführen. Die verstärkte Löslichkeit der desmosomalen Cadherine sowie deren verringerte Proteinstabilität könnten in ihrem Ausschluss aus kardialen Zellverbindungen begründet sein, ähnlich zu den Detergenz-extrahierbaren Formen noch unprozessierter Desmogleine in Zellkulturen^{161,162}. Somit stimmen unsere Beobachtungen mit den *in-vitro*-Arbeiten überein, in denen Plakophilin als Stabilisierungspartner für desmosomale Cadherine beschrieben wurde^{97,101,138}.

Der Verlust von Plakophilin 2 in Epithelien kann kompensiert werden

Plakophilin 2 ist in mehrschichtigen Epithelien wie beispielsweise der Haut oder einschichtigen Epithelien des Darms, der Leber, der Niere und des Magens exprimiert und wichtiger Bestandteil von Desmosomen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen in verschiedenen Epithelien wie dem einschichtigen Magenepithel und in der mehrschichtigen Haut, morphologisch normal aussehende Desmosomen aufweisen. Da diese Epithelien auch Plakophilin 3 exprimieren^{69,109}, kann dieses Protein möglicherweise strukturell und funktionell den Verlust von Plakophilin 2 kompensieren. Es ist ebenfalls denkbar, dass auch

Plakophilin 1, zum Beispiel in späteren Stadien der Hautentwicklung, bei der Bildung eines mehrschichtigen Epithels in einigen suprabasalen Zellschichten für Plakophilin 2 einspringen kann. Zum Zeitpunkt der embryonalen Letalität (E10.75) der Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen, besteht die Haut jedoch größtenteils aus zwei Schichten, der Basalschicht und dem Periderm¹⁶³. Die Analyse differenzierter Epithelien, speziell der Epidermis, konnte daher nicht bearbeitet werden.

Die funktionellen Unterschiede von Plakophilin 2 und Plakoglobin

Die kardialen Veränderungen in Plakophilin 2^{-/-}-Embryonen treten zu einem ähnlichen Zeitpunkt auf wie die in früheren Arbeiten beschriebenen Deletionen eines weiteren Armadillo-Proteins, dem Plakoglobin^{40,41}. Die Analyse der molekularen Veränderungen in der Zytoskelett-Architektur Plakophilin 2-defizienter Herzen in der Maus zeigt jedoch trotz der groben Ähnlichkeiten zu Plakoglobin-Deletionen starke Differenzen. Plakoglobin (γ -Catenin) ist ein weiteres Mitglied der Armadillo-Familie und im Gegensatz zu Plakophilin 2 nicht nur Bestandteil zytoplasmatischer Plaques von Desmosomen, sondern auch anderer Zellverbindungen. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits früher eine Nullmutation von Plakoglobin in der Maus generiert⁴¹. Homozygote Mutanten sterben zwischen Tag 12-16 der Embryonalentwicklung aufgrund defekter Herzfunktion. Oft platzen die Ventrikel, und Blut fließt in das Perikard. In Plakoglobin-defizienten Herzen können typische Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen morphologisch nicht mehr unterschieden werden. Stattdessen bilden sich besonders langgestreckte Adhärenz-ähnliche Verbindungen, welche jedoch desmosomale Proteine wie Desmoplakin enthalten. Daher scheint Plakoglobin eine entscheidende Rolle in der Segregation der Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen zu spielen, was auch in Zellkulturexperimenten gezeigt wurde²⁹. Somit übt Plakoglobin ebenfalls eine bedeutende Funktion in der Architektur der Glanzstreifen und der Stabilität des Herzgewebes aus. Während im Unterschied zu Plakophilin 2 in Plakoglobin-defizienten Herzen, Desmoplakin mit den Plaques der Zellverbindungen assoziiert bleibt, es also nicht essentiell für die Bindung von Desmoplakin an die Glanzstreifen ist, so befindet sich Desmoplakin jedoch nicht mehr an den Plaques in der Abwesenheit von Plakophilin 2. Daher ist Plakophilin 2 im Gegensatz zu Plakoglobin zum einen essentiell für die Bindung von Desmoplakin an die

Zellverbindungen der Kardiomyozyten und zum anderen hat es eine Schlüsselfunktion im Aufbau kardialer Zelladhäsionskomplexe.

Plakophilin 2-Mutationen in ARVC-Patienten

Nach der Publikation der Plakoglobin-Deletion in der Maus, welche zu Rissen in den Herzwänden führt, wurde gefunden, dass die Naxos-Krankheit durch eine Deletion im Gen für Plakoglobin hervorgerufen wird^{40,41,44}. Basierend auf den Ergebnissen des Deletionsmodells für Plakophilin 2 in der Maus stellten wir die Hypothese auf, dass auch Mutationen im Gen für Plakophilin 2 für Kardiomyopathien beim Menschen verantwortlich sein könnten. Tatsächlich ergaben Sequenzanalysen, dass mehr als 25% der untersuchten ARVC-Patienten eine heterozygote Mutation im Gen für Plakophilin 2 tragen¹⁵⁹. Da die gefundenen PKP2-Mutationen beim Menschen heterozygot sind, also nur ein Allel betreffen, können sie nicht direkt mit der Nullmutation der Maus verglichen werden. Jedoch reißen sie sich in den Befund der essentiellen Rolle von Plakophilin 2 im Herz ein. Möglicherweise konnten keine homozygoten Mutationen in PKP2 bei ARVC-Patienten detektiert werden, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit, ähnlich der Nullmutation in der Maus zur embryonalen Letalität führen. Entsprechend sind vorwiegend mildere Interferenzen mit der Funktion von Plakophilin 2, wie die beschriebenen heterozygoten Mutationen, beim Menschen zu finden. In zwei untersuchten ARVC-Familien (EPF und A100) war die Krankheit bei der Mehrheit der Mutationsträger nicht vollständig penetrant, jedoch sind alle von ARVC betroffenen Patienten auch Träger der Mutation, was darauf hinweist, dass die Mutation mit der Erkrankung segregiert (Abb.19). ARVC wird nach definierten Krankheitssymptomen (Task-Force-Kriterien nach McKenna) diagnostiziert¹⁶⁴. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Mutationen im Plakophilin 2-Gen in ARVC häufig sind, aber mit einer variablen Expression des Krankheitsphänotyps einhergehen, dessen Ursachen noch unbekannt sind.

Arrhythmogene-Rechts-Ventrikuläre Kardiomyopathie

Die Arrhythmogene-Rechts-Ventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine komplexe Herzmuskelerkrankung, deren klinisches Kennzeichen eine Neigung zu ventrikulären Herzrhythmusstörungen ist^{165,166}. Die ARVC betrifft ungefähr 6 von 10.000 Menschen und ist neben der hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie

ein häufiger Grund (15-25%) für den plötzlichen Herztod bei jungen Menschen im Alter von 15 bis 40 Jahren. In Deutschland sterben pro Jahr über 100.000 Menschen am plötzlichen Herztod. Insbesondere in der frühen Krankheitsphase treten die Arrhythmien und der plötzliche Herztod während oder unmittelbar nach körperlicher Belastung auf. Versterben ARVC-Patienten nicht an einem plötzlichen Herztod, so entwickeln sie im späteren Krankheitsverlauf eine schwere Herzinsuffizienz. Neben der durch Kardiomyopathien induzierten Herzinsuffizienz gibt es auch die Gruppe der erworbenen Herzinsuffizienzen wie ischämische Herzkrankheiten und Herzklappendefekte.

Während der letzten Jahrzehnte wurden chromosomale Regionen und Gene lokalisiert die für familiäre Kardiomyopathien verantwortlich sind (Übersicht¹⁶⁷), (Tabelle 3). Viele der bisher bekannten betroffenen Gene in Kardiomyopathien kodieren für strukturelle Proteine wie Desmin, Desmoplakin, Plakoglobin und Titin, aber auch für Proteine, die direkt am kontraktilen Apparat (MLC3, Troponin 1, Tropomyosin 1 α) beteiligt sind und Proteine, die den Kalziumhaushalt regulieren (z.B. RYR, SERCA2, Phospholamban). Bei ARVC wird in bis zu 80% aller Fälle eine genetische Komponente vermutet^{165,166}. Am häufigsten liegt bei den genetischen Formen eine autosomal-dominante Vererbung vor, es wurden aber auch rezessive Erbgänge identifiziert. Durch Kopplungsstudien konnten bisher neun genomische Loci¹⁶⁸⁻¹⁷⁵ für ARVC ausfindig gemacht werden. Für autosomal-dominante Formen konnten als Krankheitsgene der kardiale Ryanodin-Rezeptor (RYR2) auf Chromosom 1q42-q43 und Desmoplakin (DP) auf Chromosom 6p24 identifiziert werden^{150,176}. Zusätzlich zeigen unsere Ergebnisse, dass auch Mutationen im Gen für Plakophilin 2 auf Chromosom 12p11 für autosomal-

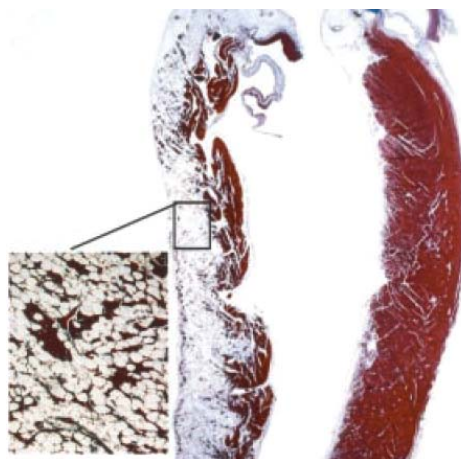


Abb. 23: ARVC in einem histologischen Schnitt. Trichrome-Färbung von histologischen Schnitten durch den rechten Ventrikel eines gesunden (rechts, 3-fach) und an ARVC erkrankten Boxer-Hundes (links, 3-fach und Vergrößerung (10-fach)). Die weißen Regionen zeigen die massive Einlagerung von Fettgewebe zwischen kardialem Muskelgewebe im dilatierten rechten Ventrikel (nicht sichtbar), die Blaufärbung markiert Bindegewebe¹⁷⁷.

Dominant vererbare Formen von ARVC verantwortlich sind¹⁵⁹. Plakophilin 2 reiht sich somit in die Liste der strukturellen Proteine ein, deren Mutationen zu Kardiomyopathien führen. Für die autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsform (Naxos-Krankheit) konnte schon früher eine Mutation im Plakoglobinen (JUP) auf Chromosom 17q21 nachgewiesen werden⁴⁴.

Bei der ARVC kommt es zu einem fortschreitenden Ersatz von normalen ventrikulären Muskelzellen durch fibröses Gewebe und Fett (Abb. 23). Zu Beginn sind in der Regel nur spezifische Regionen des rechten Ventrikels betroffen, im weiteren Krankheitsverlauf wird jedoch auch häufig der linke Ventrikel in Mitleidenschaft gezogen. Da Desmoplakin, Plakoglobin und Plakophilin 2 wichtige Komponenten des Zelladhäsionskomplexes der Kardiomyozyten darstellen und deren Mutationen zu instabilen Zellverbindungen führen, wird vermutet, dass es in ARVC-Patienten mit entsprechender Mutation zur Degeneration und zum Zelltod der Kardiomyozyten kommt. Der Verlust von Kardiomyozyten wird zwar durch die Bildung von Fett- und Bindegewebe ersetzt, jedoch führen diese histologischen Veränderungen im Herzmuskel zu lokalen Störungen in der Erregungsleitung und daraus resultierenden ventrikulären Arrhythmien. Der genaue Krankheitsmechanismus basierend auf Mutationen in den Genen für Desmoplakin, Plakoglobin und Plakophilin 2 bleibt jedoch unbekannt.

Haploinsuffizienz oder dominant-negative Mechanismen der Plakophilin 2 Mutationen

Da über die Mechanismen der zu ARVC führenden Plakophilin 2-Mutationen bisher nichts bekannt ist, sollen weiterführende Untersuchungen darüber Aufschluß geben. Humane ARVC-verursachende Mutationen in Plakophilin 2 könnten zum einen zu Haploinsuffizienz, zum anderen aber auch zu einem dominant-negativen Phänotyp führen. Es wäre interessant, beide Mechanismen in Tiermodellen zu untersuchen. Verkürzte Formen von Plakophilin 2, die sich in dominant-negativer Weise verhalten, könnten möglicherweise mit dem Wildtypprotein interferieren und dessen Funktion nachteilig beeinflussen. Zunächst sollen Herzbiopsien von ARVC-Patienten mit einer PKP2-Mutation für Expressionsanalysen genutzt werden. Das Ergebnis einer Western-Blot-Analyse eines Patienten der A100-

Tabelle 3: Für Kardiomyopathien verantwortliche Gene beim Menschen

Abkürzung	Chromosom (Mensch)	Genprodukt
kontraktiler Proteine		
ACTC	15q11-14	kardiales α -Aktin
VCL	10q22.1-q23	Metavinculin
MYBPC3	11p11.2	kardiales myosinbindendes Protein C
MYH6	14q12	kardiale α -Isoform der Myosin Schwereketten 6
MYH7	14q12	kardiale α -Isoform der Myosin Schwereketten 7
MYL2	12q23-24.3	Myosin Leichtkette 2
MYL3	3p21.2-21.3	Myosin Leichtkette 3
TNNI3	19q13.4	Troponin I
TPM1	15q22.1	Tropomyosin 1 α
TNNT2	1q32	kardiale Isoform von Troponin T2
strukturelle Proteine		
JUP	17q21	Plakoglobin
DP	6p24	Desmoplakin
PKP2	12q11	Plakophilin 2
DES	2q35	Desmin
LMNA	1q21.2-21.3	LamininA/C
TTN	2q31	Titin
TCAP	17q12	Titin-Cap
SGCB	4q12	β -Sarcoglycan
SGCD	5q33-34	δ -Sarcoglycan
kalziumregulatorische Proteine		
PLN	6q22.1	Phospholamban
SERCA2	12q23-q24.1	Sarcomeric-Retikulum-Ca ²⁺ ATPase
RYR	1q42-q43	Ryanodin-Rezeptor

Familie mit einer Deletionsmutation im Cystein 693 (in der sechsten Armadillo Wiederholung), zeigte nicht das erwartete trunkierte Protein von 83 kDa, jedoch eine reduzierte Menge des Wildtypproteins¹⁵⁹ (Abb. 20). Möglicherweise ist ein fehlerhaft gebildetes Plakophilin 2-Protein instabil oder es kommt schon zuvor zum Abbau der mutierten Plakophilin 2-mRNA (Nonsense-mediated mRNA decay). Das Western-Blot-Ergebnis lässt somit auf Haploinsuffizienz im Fall der PKP2-Mutation 2076_2077delAA schließen. Ob jedoch Haploinsuffizienz auch für andere der ARVC-verursachenden Mutationen in Plakophilin 2 zutrifft, ist bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund wäre es von Bedeutung, einige PKP2-Mutationen, die in ARVC-Patienten auftreten, in Zellkulturexperimenten zu analysieren. Zunächst müssten Mutationen aufgedeckt werden, die zu trunkierten Proteinen führen. Dafür sollen einerseits (wie oben erwähnt) weitere Biopsien von Patienten mit einer PKP2-Mutation im Western-Blot auf verkürzte Proteine getestet werden, andererseits können Mutationen kloniert werden, um sie in Säugerzellen zu exprimieren. Aufgrund des limitierten Materials und durch eingeschränkten Zugang zu Patienten, wäre die zweite Methode zu bevorzugen. In

Zellkulturexperimenten mit Kardiomyozyten oder stabilen Zelllinien, die entsprechende desmosomale Komponenten des kardialen Zelladhäsionskomplexes exprimieren, kann der Einfluss trunkierter Plakophilin 2-Proteine auf den Zusammenbau und die Stabilität von Desmosomen untersucht werden¹³⁸. Die Zusammensetzung und Architektur der Desmosomen und Adhärenz-Verbindungen können mit verschiedenen Techniken, wie Immunfluoreszenzmikroskopie, Elektronenmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie analysiert werden. Um dominant-negative Effekte, die aus der Anwesenheit von trunkierten Proteinen entstehen in einem Mausmodell zu analysieren, wäre es möglich das Wildtyp-Allel über homologe Rekombination durch eine mutierte Form zu ersetzen (*Knock-in*) oder transgene Mäuse zu generieren, die eine spezifische Mutation im Plakophilin 2-Gen überexprimieren.

Mögliche heterozygote Maus-Modelle zur Aufklärung eines haploinsuffizienten Plakophilin 2-Krankheitsmechanismus

Die Auswirkung von Haploinsuffizienz kann ebenfalls in einem Modell mit heterozygoten Pkp2-mutierten Mäusen analysiert werden. Erste Untersuchungen junger Pkp2^{+/-}-Mäuse zeigten, dass sie unter basalen Bedingungen gesund und fruchtbar sind und nicht an plötzlichem Herztod sterben. Wie in ARVC-Patienten (2076_2077delAA), sind die PKP2-mRNA und -Proteinmengen aus Pkp2^{+/-}-Mäusen reduziert (Abb. 21). Es wäre daher interessant, ältere Mäuse (bis zu einem Jahr und älter) zu beobachten und verschiedene kardiale Belastungsmodelle anzuwenden. Versuchstiere müssten auf typische ARVC-Phänotypen, wie den Ersatz von ventrikulären Kardiomyozyten durch Fett- und Bindegewebe sowie ventrikuläre Arrhythmien und Herzversagen, untersucht werden. Das Vorhandensein von Arrhythmien kann mit einer Langzeit-Elektrokardiographie an lebenden Mäusen oder an isolierten Herzen gemessen werden¹⁷⁸. Echokardiographische Untersuchungen geben Aufschluss über Veränderungen in der Herzmorphologie sowie der Herzfunktion (Schlagvolumen, Kontraktilität, Kinetik). Histologische Analysen wie HE-Färbungen und Trichrome-Färbungen klären das Vorhandensein von Binde- und Fettgewebe im Herzmuskel auf. Die molekulare Zusammensetzung der Glanzstreifen, das Vorhandensein von Zellverbindungen und ihr morphologisches Erscheinungsbild sowie deren Anzahl kann mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Untersuchungen und

Elektronenmikroskopie genauer analysiert werden. Da Mäuse im Gegensatz zum Menschen möglicherweise mit milderer Phänotypen auf den Verlust eines Allels reagieren, wäre unter Umständen die Applikation von kardialen Belastungsmodellen angebracht. Möglichkeiten von definiertem kardialen Stress sind beispielsweise das Einengen der abdominalen Aorta¹⁷⁹ und die Verabreichung von Polystyrene-Kügelchen über die Jugularvene¹⁸⁰. Die Einengung der abdominalen Aorta (aortisches Banding) reduziert dessen Durchmesser um einen definierten Teil und führt zu erhöhten Belastungen für das Herz, welches gegen den verstärkten Druck pumpen muss. Kontrolltiere kompensieren diese Belastungen bekanntlich schon nach ungefähr einer Woche durch Hypertrophie. Mutationen in verschiedenen Genen, die wichtig für die strukturelle und entwicklungsbiologische Herzfunktion sind (β -MHC und ErbB2), führen jedoch zum Verlust dieses Kompensationsmechanismus. In der Folge kommt es zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz, was Auswirkungen von entsprechenden Mutationen beim Menschen widerspiegelt^{179,181,182}. Polystyrene-Kügelchen werden kathetergestützt über die Jugularvene in die Pulmonalarterienstrombahn injiziert und führen zu kleinen Gefäßverschlüssen in der Lunge und daraus folgender pulmonaler Hypertonie. Diese Methode ist besonders als rechts-ventrikuläres Belastungsmodell anwendbar und daher speziell für das Verständnis von ARVC interessant.

Ist das Krankheitsbild der ARVC-Patienten in der Maus reproduzierbar, so könnten weitere Untersuchungen folgen, die der histologischen und molekularen Feinanalyse dienen. Proben von Wildtyp versus Pkp2^{+/-}-belasteten und -unbelasteten Herzen können beispielsweise für Genexpressionsanalysen im großen Maßstab genutzt werden. Damit könnten abweichende Expressionen anderer Proteine erfasst werden, welche Aufschluss über die molekularen Veränderungen in den Glanzstreifen der Herzpatienten geben und Ursachen für pathologische Veränderungen im Herz aufklären.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Analyse doppelt heterozygoter Mäuse. Plakoglobin ist auf molekularer Ebene nicht essentiell für die Fixierung von Desmoplakin an die Glanzstreifen der Kardiomyozyten, was jedoch die primäre Funktion von Plakophilin 2 darstellt. Daher vollführen Plakoglobin und Plakophilin 2 unterschiedliche Aufgaben in der Stabilität von Desmosomen und der Integrität von Geweben. Die Bildung von doppelt heterozygot-mutierten

Mäusen könnte somit zu einem stärkeren Phänotyp führen als einzelne heterozygote Mutationen und repräsentiert ein weiteres mögliches Mausmodell zur Analyse von ARVC verursachenden Mutationen.

Materialien und Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden, Chemikalien, Kits und Geräte

Die im folgenden nicht näher beschriebenen Standardmethoden wurden aus den Laborhandbüchern von Sambrock *et al.* (1989)¹⁸³ und Ausubel *et al.* (1987)¹⁸⁴ übernommen. Diese Methoden waren: Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Maßstab, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linerisierter DNA, Ligationsreaktionen, Transformation von Bakterien sowie Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen und Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosemembranen. Nach Angaben der Hersteller wurden durchgeführt: Die Plasmid-DNA-Präparation in quantitativem Maßstab (Qiagen), die Elution von DNA aus Agarosegelen (Qiagen), die radioaktive Markierung von DNA (Megaprime-DNA-labelling-System, Amersham), Chemilumineszenzreaktionen (ECL-Detection-Kit, Amersham) und die DNA-Sequenzierung (Thermo-sequenase-fluorescent-labelled-primer-cycle-sequencing kit, Amersham).

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen), radioaktive Nukleotide von Amersham Buchler (Braunschweig), Enzyme von Boehringer Mannheim (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Oligonukleotide von BioTeZ (Berlin) bezogen. Die verwendeten Geräte waren: Bio-Imaging-Analyzer (Fujix BAS 2000, Fuji), DNA Sequenzer 4000L (MWG-Biotech), Minifuge RF (Heraeus Sepatech), Centrifuge 5402 (Eppendorf), Centrifuge J2-21 (Beckman) mit Rotoren JA 10 und Ultracentrifuge TL-100 (Beckman) mit Rotoren TLA 100.3 und TLV 100.

Bakterienstämme und verwendete Plasmide

Es wurden ausschließlich konjugationsdefiziente K12-Sicherheitsstämme von *E.coli* verwendet:

-XL-1 Blue [*F'*, *Tn10* (*tet^r*), *proAB*⁺, *lacI*^q, $\Delta(lac)M15$, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*, *gyrA96*]

-pBluescript II SK⁺ (Stratagene) wurde für DNA-Klonierungsschritte eingesetzt sowie die Klonierung von Northern- und Southern-Sonden.

Konstruktion des Rekombinationsvektors, Kultivierung, Elektroporation und Selektion von Zellen

Der Plakophilin 2-Mausstamm wurde von Martin Behrend und Jörg Hülken wie folgt generiert und zur Phänotypenanalyse zur Verfügung gestellt. Als Ausgangsvektor für die Konstruktion des Rekombinationsvektors wurde eine weiterentwickelte Form des Vektors pTV0¹⁸⁵ eingesetzt. Dieser Vektor enthält ein Neomycinresistenzgen (neo) und das Thymidinkinasegen des *Herpes Simplex* Virus. Die zwei Gene liegen unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promoters. Ein Teil des murinen Plakophilin 2-Gens (Exon 1 und 2 sowie dazugehörige Intronsequenzen) wurde aus einer λ -FIX-II-129/SVJ-Bibliothek (Stratagene) isoliert, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und so in den Rekombinationsvektor kloniert, dass die neo-Kassette eine genomischen Sequenz (7.8 Kb) von der NotI-Schnittstelle in Exon 1 bis zu einer BamHI-Schnittstelle in Intron 1 ersetzt. Das Neomycinresistenzgen (neo) wurde in entgegengesetzte Leserichtung zum Plakophilin 2-Gen eingefügt. Es wurde eine Nullmutation im Plakophilin 2-Gen generiert, da die Anwesenheit der Neo-Kassette ein Spleißereignis zwischen Exon 1 und Exon 2 verhindert und es nach 43 Aminosäuren zu einem verfrühten Stop in der Translation von Plakophilin 2 kommt.

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie E14.1 (isoliert von Jörg Hülken) wurden ursprünglich aus der inneren Zellmasse einer männlichen Blastozyste der Mauslinie 129/Ola gewonnen^{186,187}. Die ES-Zellen wurden in DMEM (Gibco, #31966-021, 4500 mg/l Glukose, Glutamax und Pyruvat) supplementiert mit 15% fötalem Kälberserum (Sigma, #F7524), 100 μ g/ml Streptomycin und 100 μ g/ml Penicillin (Gibco, #), 1% nichtessentiellen Aminosäuren (Gibco, #), 100 μ m 2-Mercaptoethanol (Gibco) und 500 U/ml LIF (Esgro, Temecula, CA, USA) kultiviert. Diese Kultur erfolgte als Kokultur mit wachstumsinaktivierten embryonalen Fibroblasten. Neomycin-resistente embryonale Fibroblasten (Feeder-Zellen) wurden aus E16.5 Mausembryonen der Plakoglobin defizienten Mauslinie⁴¹ durch Christian Asbrand gewonnen. Feeder-Zellen wurden zunächst in DMEM (Gibco, wie für ES-Zellen angegeben, jedoch ohne LIF) über fünf Passagen kultiviert und anschließend durch Behandlung mit 10 μ g/ml Mitomycin C (Sigma) wachstumsinaktiviert, um für die Kokultur mit ES-Zellen eingesetzt zu werden. Alle Zellen wurden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 7.5% CO₂-Gehalt

kultiviert. Im Abstand von drei Tagen wurden die ES-Zellen 1:3 verdünnt, wozu sie zunächst mit PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) gewaschen und dann durch Zugabe von Trypsinlösung (0.5 mM EDTA und 2 mg/ml Trypsin in PBS) von der Petrischale abgelöst wurden. Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert, sedimentiert (300 x g, 5min), in Einfriermedium (DMEM, 50% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in Styropor verpackt bei -80°C langsam eingefroren. Nach einem Tag wurden die Zellen in Flüssigstickstoff überführt.

ES-Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert: zu 10⁷ Zellen in 800 µl PBS wurde 20 µg linearisierter Rekombinationsvektor zugefügt und in einer 4 mm-Küvette bei 240 V und 500 µF (Genepulser, Biorad) transfiziert. Die Zellen wurden nach der Elektroporation auf vier 10 cm-Zellkulturschalen mit Feeder-Zellen verteilt. Am nächsten Tag wurde dem Zellkulturmedium 400 µg/ml G418 (Gibco) und ab dem fünften Tag 2 µM Gancyclovir (Syntex) zugesetzt. Somit wurden ES-Zellklone, welche die linearisierte DNA des Rekombinationsvektors in ihr Genom aufgenommen haben, positiv auf Neomycinresistenz selektioniert. Klone, bei denen diese Integration durch homologe Rekombination stattgefunden hat, verlieren die HSV-TK Kasette. Dagegen verbleibt bei zufälliger Integration diese Kasette im Genom. In diesem Fall können die betreffenden Zellen durch Zusatz des Nukleosidanalogs Gancyclovir, welches nach Phosphorylierung durch die HSV-TK in die DNA eingebaut wird und zum Absterben der Zellen führt, negativ selektioniert werden. Nach sieben bis acht Tagen konnten Zellklone mit einer Pipette in 25 µl PBS abgelöst und in 96-Loch-Platten in 25 µl Trypsinlösung vereinzelt werden. Dieser Prozess wurde nach 10 min durch Zugabe von 200 µl ES-Zellmedium abgestoppt und die Zellen anschließend für vier Tage kultiviert. Dann wurden 2/3 der Zellen wie oben beschrieben eingefroren und der Rest auf mit 0,5% Gelatine in PBS vorbehandelten 96-Loch Platten bis zur vollständigen Konfluenz weiterkultiviert. Aus diesen Zellen wurde genomische DNA nach der Methode von Ramirez-Solis *et al.* (1992) isoliert¹⁸⁸. Zwei unabhängige positive ES-Zellklone, bei denen ein Allel mit dem Rekombinationsvektor rekombiniert hat, wurden für die Blastozysteninjektionen genutzt¹⁸⁹. Die chimären Blastozysten wurden in den Uterus scheinschwangerer Ammenmäuse injiziert. Da die ES-Zelllinie E14.1 aus weißen Mäusen (129/SV) erstellt wurde und C57Bl/6J Mäuse eine schwarze Fellfarbe besitzen, lässt sich der Chimaritätsgrad der Nachkommen

anhand der Fellfarbe abschätzen. Chimäre Männchen, die aus den Blastozysteninjektionen hervorgegangen waren, wurden mit C57Bl/6J Weibchen verpaart. F1-Nachkommen mit braunem Fell wurden mittels PCR und Southern-Blot-Analyse genotypisiert.

Genotypisierungen, Southern-Blot und Northern-Blot

Für die Genotypisierung der Tiere wurde die PCR-Methode genutzt. Zunächst wurden Ohrbiopsien in 30 µl Lysepuffer (100 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 0.2 µg/µl Proteinase K) über Nacht bei 55°C inkubiert. Die verwendeten Oligonukleotide für die PCR waren 438 (GAT CCT GGG TCA CCT GGA CA), 569 (AGG GTC TGC TGC ACC TGC T) und NSN (CTT CTG AGG GGA TCG GCA ATA). Diese Oligonukleotide wurden wie folgt eingesetzt: 1.5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer, 0.6 µl MgCl₂ (50 mM), 0.375 µl dNTPs (je 10 mM), 0.2 µl 438 (100 µM), 0.1 µl 569 (100 µM), 0.1 µl NSN (100 µM), 0.2 µl Taq Polymerase, 9.925 µl ddH₂O, 2 µl Lysat (1:40). Das PCR-Programm [95°C 1 min, (96°C 6s, 61°C 10s, 72°C 20s), 45 Zyklen, 4°C] ergab ein Wildtypfragment von 130 bp und ein Fragment des mutierten Allels von 230 bp.

Für Southern-Blot-Analysen wurden Embryonen um E10.75 in 500 µl Lysepuffer inkubiert (siehe oben), Phenol-Chloroform extrahiert und mit 99% Ethanol gefällt sowie mit 70% Ethanol gewaschen. Die genomische DNA wurde in ddH₂O aufgenommen und die Konzentration photometrisch gemessen. Für einen Restriktionsendonukleaseverdau wurden 10 µg genomische DNA über Nacht bei 37°C verdaut, am nächsten Morgen wurde der Ansatz bei 60°C auf 20 µl eingedampft und in einem 0.65% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 min in Denaturierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), 30 min in Neutralisierungspuffer (1 M Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl) und 30 min in 20x SSC (100 ml: 175g NaCl, 88g Na-Citrat, pH 7.0) gewaschen, bevor ein Kapillarblot in 20x SSC pH 7.0 aufgebaut wurde (Membran: Hybond N+, #RPN203B, Amersham). Am nächsten Morgen wurde die Membran mit UV-Licht bestrahlt und die Membran in Hybridisierungslösung (100 ml: 50 ml Formamid, 25 ml 20x SSC pH 7.0, 5 ml 100x Denhard's, 2 ml 50 mM Na-EDTA, 2 ml ssDNA (10 mg/ml), 10 ml 10%SDS, 10 ml 50% Dextransulfat) bei 42°C präinkubiert. Währenddessen wurden die DNA-Sonden (neo-Sonde, gesamte cDNA von Neomycin; ext-Sonde, Teil der genomischen Sequenz des Pkp2-Lokus außerhalb

des Rekombinationsvektors) mit α - ^{32}P dCTP markiert (Amersham Biosciences, Megaprime-DNA Labeling System, #RPN1605 nach Protokoll des Herstellers), dann zur Prähybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 1x 15 min in Waschlösung 1 (2x SSC, 0.1% SDS), 2x 15 min mit Waschlösung 2 (0.2x SSC, 0.1% SDS) bei 65°C gewaschen und danach Phosphoimagerplatten (Fuji) oder Kodak-Filme aufgelegt.

Für Northern-Blot-Analysen wurden E10.75 Embryonen oder adulte murine Herzen in Trizol (Gibco) mechanisch homogenisiert und RNA isoliert (nach dem Protokoll des Herstellers) sowie dessen Konzentration photometrisch bestimmt. Das gesamte ddH₂O, welches über den Versuch genutzt wurde, war zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0.1%) behandelt worden. Auf einem denaturierendem RNA-Gel (200 ml: 170 ml ddH₂O, 1.6 g Agarose, 20 ml 10x MOPS, 10.5 ml 37% Paraformaldehyde und Ethidiumbromid) wurden jeweils 8 µg RNA geladen und in 1x MOPS (Anleitung siehe Roche) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 4x 30 min mit ddH₂O gewaschen, dann 30 min in Denaturierungspuffer (50 mM NaOH, 10 mM NaCl), 30 min in Neutralisierungspuffer (100 mM Tris pH 7.5) sowie 30 min in 20x SSC geschwenkt, bevor ein Kapillarblot (Membran: Hybond N, #RPN203N, Amersham) mit 20x SSC aufgebaut wurde. Am nächsten Morgen wurde die RNA auf der Membran mit UV-Licht vernetzt und die Membran in Prähybridisierungslösung (ExpressHyb, #636813, BD Biosciences) bei 68°C inkubiert, bevor die radioaktive DNA-Sonde (C-Terminus und Teil der 5'UTR von Pkp2; Nukleotide: 1748-2761) zugefügt wurde (siehe Southern-Blot, nach Protokoll des Herstellers). Die Hybridisierung fand bei 68°C über Nacht statt. Am nächsten Morgen wurde die Membran 2x 15 min in Waschlösung 1 (2x SSC, 0,1% SDS), 2x 15 min mit Waschlösung 2 (0,2x SSC, 0,1% SDS) bei 68°C gewaschen und danach Phosphoimagerplatten oder Kodak-Filme aufgelegt.

Embryoschnitte und -färbungen

Für Paraffinschnitte wurden Embryonen und Dottersäcke in PBS präpariert und über Nacht in 4% PFA in PBS fixiert. Danach wurden Embryonen in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 90%, 96% Ethanol, 2x reines Ethanol) jeweils 1 Stunde entwässert, 2x 45 min in Toluol inkubiert und über Nacht in flüssiges 60°C warmes Paraffin überführt, bevor sie dann in Paraffin eingebettet

wurden. Mit einem Mikrotom (Microm, Heidelberg) wurden in der Regel 7 µm dünne Schnitte angefertigt und für histologische Übersichtsfärbungen, wie HE-Färbungen genutzt. Die auf Objektträgern getrockneten Schnitte wurden zunächst ca. 2 h im 60°C erwärmt, dann 3x je 7 min in Xylol vom Paraffin befreit und in absteigender Ethanol-Reihe (2x reines Ethanol, 96%, 90%, 80%, 70% Ethanol) rehydriert. Die Schnitte wurden als nächstes 1 min in Hämatoxylin gefärbt und sofort für 10 min in warmes, wechselndes Leitungswasser überführt, danach 5 min in 0.1% alkoholischem Eosin gefärbt, wieder dehydriert und anschließend in Entellan (Merck) eingedeckelt.

Weitere histologische Schnitte (1 µm) wurden von in EPON eingebetteten Embryonen angefertigt. Die Schnitte wurden auf APES-beschichteten Objektträgern gesammelt und bei 60°C getrocknet. Danach 3 min mit Toluidinblau bei 60°C gefärbt, mit ddH₂O gewaschen und bei 60°C getrocknet in Entellan eingedeckelt und fotografiert.

Immunhistochemie

Für die Pecam-Färbung wurden Embryonen samt Dottersack in PBS präpariert und über Nacht in Methanol-DMSO (4:1) bei 4°C fixiert. Endogene Peroxidase wurde durch eine Inkubation der Embryonen für 4-5 h in Methanol-DMSO-H₂O₂ (4:1:1) inhibiert. Danach wurden Embryonen 2x für jeweils 1h in PBS mit 2% Milchpulver und 0.1% TritonX-100 (PBSMT) inkubiert, bevor sie über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper Pecam-1 aus der Ratte (PharMingen, #557355, 1:250) in PBSMT inkubiert wurden. Danach folgten zwei Waschschrte in PBSMT bei 4°C und drei Waschschrte in PBSMT bei RT. Die Embryonen wurden dann mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Esel-anti-Ratte-POD, Dianova) über Nacht bei 4°C in PBSMT inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Waschschrte vom Vortag wiederholt und mit einem letzten Waschschrte mit PBST bei 4°C abgeschlossen. Die Embryonen wurden danach mit einer Färbelösung, welche Diaminobenzidin (DAB) enthält (10 ml: 1 ml 1 M Tris pH 7.5, 80 µl 5% NiCl₂, 100 µl DAB (30 mg/ml), 2 µl 35% H₂O₂, 3.25 ml 2% NaN₃, 5.57 ml ddH₂O) inkubiert. Von der Peroxidase wird DAB in einen Blauton umgewandelt, der Farbumschlag dauert ca. 20 min und kann durch Entfernung des Substrats (waschen mit PBS) abgestoppt werden. Anschließend wurden Fotos gemacht. Danach wurden die Embryonen in Lysepuffer inkubiert und genotypisiert

Immunfluoreszenzmikroskopie

Für Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Embryonen in PBS präpariert und direkt in Tissue Tek (Sakura) eingefroren. Der Gefriervorgang wurde entweder in Flüssigstickstoff tiefgekühlten Isopentan oder auf einem in Ethanol-Trockeneis gekühlten Metallblock vollzogen. Kryostatschnitte und Plakophilin 2-Immunfärbungen wurden teilweise in Berlin angefertigt, jedoch zum Großteil auf Trockeneis nach Heidelberg zu Christine Grund versandt und weiterverarbeitet. Wenn nicht anders beschrieben, so wurden 7 µm Kryostatschnitte in -20°C Aceton für 10 min fixiert, luftgetrocknet und dann mit den primären Antikörpern (in PBS, 10% FCS) für 1 h bei RT inkubiert. Die primären Antikörper waren polyklonale Meerschweinchenantikörper oder murine monoklonale Antikörper gegen Plakophilin 2 (Progen Biotechnik GmbH,^{1,190}), murine monoklonale Antikörper (Progen) oder polyklonale Kaninchenantikörper (NaTuTec) gegen Desmoplakin, murine monoklonale Antikörper sowie Meerschweinchen- oder Kaninchenantikörper gegen Desmoglein 2 (Progen,¹⁹¹⁻¹⁹⁴), β-Catenin (monoklonaler Antikörper, Zymed Laboratories), N-Cadherin (monoklonaler Antikörper, Transduction Laboratories) und Plakoglobin (monoklonaler Antikörper, Progen). Nach der Primärantikörperinkubation wurden die fixierten Schnitte 3x 5 min mit PBS gewaschen und mit den Sekundärantikörpern sowie teilweise mit DAPI (1 µg/ml) in PBS/FCS für 30 min bei RT inkubiert. Die sekundären Antikörper waren mit Alexa 568 und Alexa 488 gekoppelt (MoBiTec, Molecular Probes). Nach der Sekundär-Antikörperinkubation wurden die Schnitte in PBS gewaschen und mit Fluoromount (Biozol) oder Immumount (Thermo Shandon) eingedeckelt. Fotos wurden mit Axiophot und LSM 510 Mikroskopen (beide von Carl Zeiss Microimaging, Inc) gemacht.

Elektronen und Immuielektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Embryonen in PBS präpariert, ca. 30 min in 3% PFA in PBS anfixiert und dann in 8% PFA, 0.1% Glutaraldehyd in PBS weiterfixiert und bis zu 7 d bei 4°C gelagert und an Bettina Erdmann für die Osmierung und Einbettung in EPON weitergegeben. Von eingebetteten Embryonen wurden mit Glasmessern Semidünnschnitte (1 µm) für Übersichtsfärbungen angefertigt und bis zur entsprechenden Stelle für elektronenmikroskopische Aufnahmen vorgeschnitten. Ultradünnschnitte und

elektronenmikroskopische Aufnahmen von Atrium, Ventrikel, Magenepithel und Haut sowie Aorta und Kapillaren wurden von Bettina Erdmann angefertigt.

Die Immunelektronenmikroskopie wurde von Christine Grund angefertigt. Für Immunelektronenmikroskopie wurden 5 µm dünne Kryostatschnitte auf Objektträgern gesammelt, 10 min in 2% PFA in PBS fixiert, für 5 min mit 0.1% Saponin in PBS permeabilisiert und 1 h mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS wurden die Schnitte mit den sekundären Nanogold-konjugierten Antikörpern (BioTrend) für 2-4 h inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden zuvor beschrieben¹⁹⁵. Nach dem Abspülen nicht gebundener Antikörper wurden die Präparate in GA-Lösung (2.5% Glutaraldehyd, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, in Cacodylatpuffer) für 15 min bei RT fixiert, 2x 5 min in Cacodylatpuffer (50 mM Na-Cacodylat, pH 7.2) gewaschen und das Signal optional durch 3 min Inkubation in einem Entwickler/Verstärker-Gemisch („HQ Silver TM Enhancement Kit“, Nanoprobes; „R-Gent Silver Enhancement System“, Aurion Gold Reagents, Wageningen, Niederlande) silberverstärkt. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O wurde mit OsO₄-Lösung (2% OsO₄ (w/v) in ddH₂O) für 30 min bei 4°C nachfixiert. Die Dehydrierung und Einbettung erfolgte entsprechend der von Franke *et al* (1978)¹⁹⁶ beschriebenen Methode. Zunächst wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe und anschließend in 100% Propylenoxid 2x für je 15 min entwässert und schließlich über Nacht in einem Propylen/Epon-Gemisch belassen. Auf Gewebeschnitte wurde eine mit Epon gefüllte Gelatine kapsel (Serva, Heidelberg) gestülpt, die Polymerisierung erfolgte für 48 h bei 60°C. Ultradünnschnitte wurden in UA-Lösung (2% Uranylacetat (w/v) in Methanol) für 15 min und Bleicitrat (50 ml H₂O: 1.33g PbNO₃, 1.76g Na-Citrat x 2H₂O, 30 ml heißes H₂O, 8 ml 1 N NaOH) für 5 min kontrastiert und mit dem Elektronenmikroskop (Modell EM910, Carl Zeiss Microimaging, Inc) ausgewertet.

Detergenzextraktion, Gelelektrophorese und Western-Blot

Für Löslichkeitsstudien wurden acht embryonale Herzen nach der Genotypisierung in 200 µl Triton-X-100-Lysepuffer (100 ml: 2 ml 1 M HEPES pH 7.4, 1 ml 100% Triton X-100, 3 ml 5 M NaCl, 50 µl 1 M CaCl₂, Proteaseinhibitoren (Mini EDTA-frei, Roche (#1836170)) aufgenommen, sonifiziert und gevortext. Lysate wurden bei 4°C, 20000xg für 15 min zentrifugiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen

wurden getrennt und deren Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Gleiche Mengen der Triton X-100 löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden mit Hilfe eines SDS-PAGE aufgetrennt (Sammelgel: 4% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 125 mM Tris-HCL, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% Ammoniumpersulfat, 0.1% TEMED; 6% Trenngel: 6% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 300 mM Tris-HCL, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% Ammoniumpersulfat, 0.1% TEMED) und in 1x Laemmli-Elektrophoresepuffer (2.5 mM Tris-HCl pH 8.3, 19.2 mM Glyzin, 0.2% SDS) aufgetrennt¹⁹⁷. Die Proteine wurden mit einem Nass-Transfer über Nacht (200 mA, 4°C) auf eine Membran (PVDF, Immobilon-P, 45 µm, Millipore) mit Hilfe einer Elektro-Transfer Apparatur (Biorad) in Transferpuffer transferiert. Dazu wurden die Membranen kurz in Methanol gewaschen, Gele, Membranen und Whatmanpapier in Transferpuffer (1 l: 14.42 g Glyzin, 3.03 g Tris-Base, 0.1 g SDS) equilibriert, luftblasenfrei übereinander gelegt und zwischen die Elektroden gebracht. Die Membran wurde am nächsten Tag 1 h in 5% Milchpulver in PBS/0.2% Tween20 blockiert und in PBSMT mit den verschiedenen Primärantikörpern 3 h inkubiert. Zu den Primärantikörpern gehörten: monoklonale Plakophilin 2-Antikörper-Mix (Progen, 1:10 verdünnt,¹), Plakophilin 2 Meerschweinchenantikörper (HP-1, verdünnt 1:2000; Head, verdünnt 1:1000, von W.W. Franke aus Heidelberg), Plakoglobin monoklonaler Antikörper (mAK) (11E4 von W.W. Franke, Heidelberg, 1:10 verdünnt), β -Catenin mAK (Sigma, 1:1000 verdünnt), N-Cadherin mAK (Transduktion Labs, 1:2500 verdünnt), α -Tubulin mAK (Sigma, 1:3000 verdünnt), Dsc2a/b Kaninchenantikörper (rb36 von W.W. Franke, Heidelberg und Progen, 1:500 verdünnt), Dsg 2 mAK (Dsg3.10 von W.W. Franke aus Heidelberg, 1:10 verdünnt), Desmoplakin I mAK-Mix (2.17, 2.15, 2.20 von W.W. Franke aus Heidelberg, 1:10 verdünnt). Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Membranen 2x 10 min mit PBST gewaschen und dann 1 h mit den Sekundärantikörpern in PBST inkubiert. Die Sekundärantikörper (Dianova) waren Peroxidase-gekoppelt und wurden in einer Verdünnung von 1:5000 bis 1:15000 eingesetzt. Nach der Sekundärantikörperinkubation wurden die Membranen 3x 10 min mit PBST gewaschen und danach mit ECL-Chemilumineszenzreagenz für 1 min inkubiert bevor Filme (Kodak) in der Dunkelkammer belichtet und entwickelt wurden. Die Belichtungszeit variierte je nach Stärke des Signals zwischen 1 sec und 5 min. Nach Bedarf wurde die Membran 30 min in einem 50°C warmen Wasserbad gestrippt (100 mM 2-

Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8), mit PBST gewaschen und mit einem neuen Antikörper inkubiert. Für die Lyse von adulten Herzen, humanen Herzbiopsien oder gesamten Embryonen wurde RIPA-Lysepuffer (100 ml: 5 ml 1 M Tris pH 7.4, 3 ml 5 M NaCl, 1 ml 10% SDS, 1 ml 100% NP40, 500 mg Dioxycholsäure DOC, Fluka) verwendet und die Proben wie zuvor beschrieben, weiterverarbeitet. Ladekontrollen waren α -Tubulin, Erk sowie N-Cadherin.

Semiquantitative Real-Time PCR

Herzen von E10.75-Embryonen wurden zunächst in PBS präpariert und in Flüssigstickstoff tiefgefroren, bis die Embryonen mittels PCR genotypisiert wurden. Dann wurden jeweils vier Herzen von homozygoten Plakophilin 2-Embryonen und Herzen von Wildtyp-Embryonen in 450 μ l Trizol (siehe Northern-Blot) gepoolt und kräftig (20 min) gevortext, bis das Gewebe vollständig aufgelöst war. Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Für die Fällung wurde lineares Acrylamid als Fällungshilfe genutzt. Die gefällte RNA wurde in 12 μ l ddH₂O (mit 1% DEPC versetzt) aufgenommen. Für die cDNA Synthese wurden jeweils 6 μ l eingesetzt, wobei jeweils ein weiterer Ansatz mit den restlichen 6 μ l als Kontrolle ohne Zugabe von RT-Polymerase mitgeführt wurde. Für die cDNA-Synthese wurden zunächst zu je 6 μ l RNA in ddH₂O 0.5 μ l (1 μ g/ μ l) Poly(T)-Primer pipettiert, 5 min bei 70°C, 2 min auf Eis und 2 min bei RT (21°C) inkubiert. Danach wurde folgender Prä-Mix (13.3 μ l mit und ohne RT-Polymerase) hinzugefügt und 1 h bei 42°C inkubiert sowie danach 5 min auf Eis abgekühlt: 4.5 μ l ddH₂O, 2 μ l 100 μ M DTT, 1 μ l RNase Inhibitor (40 U/ μ l), 0.8 μ l 25 mM dNTPs, 4 μ l 5x Puffer, 1 μ l Superscript II-RT-Polymerase (Gibco). Für die semiquantitative RT-PCR für α -Tubulin (als interne Kontrolle), Desmoglein 2 und Desmocollin 2a/b wurden folgende Oligonukleotide so gewählt, dass Vorwärts- und Rückwärts-Primer in unterschiedlichen Exonen lagen und somit die Amplifikation von genomischer DNA durch dazwischenliegende Intronsequenzen verhindert wurde. Desmocollin 2a/b: mDsc2a/b FW: 5'-AGG GCA AAG AGA CCA TTG AGA-3', mDsc2a/b RV: 5'-GGT CAC TAC AGC AAC CCA CA-3', Produktgröße von Dsc2a, 290 bp, Dsc2b, 336 bp; mDsg2 FW: 5'-CGA AGC CGT AAG GAC AAG AG-3', mDsg2 RV: 5'-CGA CCT AGG CAA ACT TCA GC-3', Produktgröße von Dsg2, 297 bp; mTub FW: 5'-AAG GAG GAT GCT GCC AAT AA-3', mTub RV: 5'-TGG AAT TGT AGG GCT CAA CC-3', Produktgröße von

α -Tubulin, 277 bp. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils für cDNAs aus Wt- und Plakophilin 2^{-/-}-Herzen sowie den jeweiligen Kontrollen ohne RT-Polymerase angesetzt. Eine PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen: 1.5 μ l 10x Taq-Puffer, 0.6 μ l 50 mM MgCl₂, je 0.5 μ l Primer, 0.2 μ l 25 mM dNTPs, 0.2 μ l Taq-Polymerase, 10.5 μ l ddH₂O, 1 μ l Template (unverdünnt, direkt aus den Ansätzen mit und ohne RT-Polymerase). Programm: 95°C 2 min, (96°C 10 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s), 4°C. Pro Primerpaar wurden zusätzlich drei Ansätze vorbereitet, die nach unterschiedlichen Zyklenzahlen (25, 30, 35 Zyklen) abgestoppt wurden und auf einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Sequenzanalysen der ARVC-Patienten

Für klinische und genetische Studien wurden ARVC-Patienten aus den Universitätskliniken Berlin-Buch, Münster, Boston und NYC akquiriert. Rechtsventrikuläre Herzbiopsien wurden während einer diagnostischen Herzkatheter-Untersuchung entnommen¹⁵⁹. Sequenzanalysen und systematische Analysen der zwei ARVC-Familien und Biopsieentnahmen wurden von der Arbeitsgruppe L. Thierfelder vollzogen¹⁵⁹. Für Sequenzanalysen wurde genomische DNA von venösen Blutproben isoliert und die Exone des PKP2-Gens nach Standardprotokollen amplifiziert (Taq PCR Core Kit, QIAGEN, Hilden). Die Oligonukleotide umfassten die Exone und flankierende 60-100 bp der Intronsequenzen. PCR-Produkte wurden aufgereinigt und beide Stränge direkt mit dem BigDye-Terminator-DNA-Sequenzier-Kit mit Hilfe des 3100 Avant Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sequenziert. Für Mutationsanalysen wurde die Sequencher 4.1 Software genutzt. Bei PKP2-Deletions/Insertions-Mutationen wurden beide Allele der 12 ARVC-Patienten in Vektoren subkloniert und direkt sequenziert.

Abkürzungen

µm	Mikrometer
aa	Aminosäuren
ARM	Armadillo
ARVC	Arrhythmogene-Rechts-Ventrikuläre-Kardiomyopathie
ARVCF	<u>A</u> rmadillo- <u>R</u> epeat-gene-in- <u>V</u> elo- <u>C</u> ardial- <u>F</u> acial-syndrome
bp	Basenpaare
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol Hydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DP	Desmoplakin
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	Epithelial Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EVPL	Envoplakin
FCS	Fetal Calf Serum
g	Fallbeschleunigung
HE	Hämatoxylin/Eosin
IF	Intermediärfilamente
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	mol/ Liter
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
N-Cadherin	Neuronal-Cadherin
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDVF	Polyvinylidene Difluorid
PFA	Paraformaldehyd

PG	Plakoglobin
PKP	Plakophilin
PPL	Periplakin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
RT-Polymerase	Reverse-Transkriptase-Polymerase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
w/ v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin

Literaturverzeichnis

1. Mertens, C., Kuhn, C., & Franke, W. W. Plakophilins 2a and 2b: Constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *Journal of Cell Biology* 135, 1009-1025 (1996).
2. Riggelman, B., Wieschaus, E., & Schedl, P. Molecular Analysis of the Armadillo-Locus - Uniformly Distributed Transcripts and A Protein with Novel Internal Repeats Are Associated with A Drosophila Segment Polarity Gene. *Genes & Development* 3, 96-113 (1989).
3. Peifer, M. & Wieschaus, E. The Segment Polarity Gene Armadillo Encodes A Functionally Modular Protein That Is the Drosophila Homolog of Human Plakoglobin. *Cell* 63, 1167-1178 (1990).
4. Mccrea, P. D., Turck, C. W., & Gumbiner, B. A Homolog of the Armadillo Protein in Drosophila (Plakoglobin) Associated with E-Cadherin. *Science* 254, 1359-1361 (1991).
5. Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., & Kemler, R. Plakoglobin and Beta-Catenin - Distinct But Closely Related. *Science* 257, 1142-1144 (1992).
6. Peifer, M., Berg, S., & Reynolds, A. B. A Repeating Amino-Acid Motif Shared by Proteins with Diverse Cellular Roles. *Cell* 76, 789-791 (1994).
7. Franke, W. W. *et al.* Molecular-Cloning and Amino-Acid Sequence of Human Plakoglobin, the Common Junctional Plaque Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 4027-4031 (1989).
8. Reynolds, A. B., Herbert, L., Cleveland, J. L., Berg, S. T., & Gaut, J. R. P120, A Novel Substrate of Protein Tyrosine Kinase Receptors and of P60V-Src Is Related to Cadherin-Binding Factors Beta-Catenin, Plakoglobin and Armadillo. *Oncogene* 7, 2439-2445 (1992).
9. Behrens, J. *et al.* Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642 (1996).
10. Schmidt, A. *et al.* Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell and Tissue Research* 290, 481-499 (1997).
11. Simcha, I. *et al.* Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin. *Journal of Cell Biology* 141, 1433-1448 (1998).
12. Daniel, J. M. & Reynolds, A. B. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and Cellular Biology* 19, 3614-3623 (1999).

13. van de Wetering, M. *et al.* Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789-799 (1997).
14. Hecht, A., Litterst, C. M., Huber, O., & Kemler, R. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 274, 18017-18025 (1999).
15. Kolligs, F. T. *et al.* gamma-Catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes & Development* 14, 1319-1331 (2000).
16. Zhurinsky, J., Shtutman, M., & Ben Ze'ev, A. Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Molecular and Cellular Biology* 20, 4238-4252 (2000).
17. Conacci-Sorrell, M. *et al.* Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes & Development* 16, 2058-2072 (2002).
18. Miravet, S. *et al.* The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1884-1891 (2002).
19. Muller-Tidow, C. *et al.* Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2890-2904 (2004).
20. Solanas, G. *et al.* beta-catenin and plakoglobin N- and C-tails determine ligand specificity. *Journal of Biological Chemistry* 279, 49849-49856 (2004).
21. Teuliere, J. *et al.* beta-catenin-dependent and -independent effects of Delta N-plakoglobin on epidermal growth and differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 24, 8649-8661 (2004).
22. Eastman, Q. & Grosschedl, R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 233-240 (1999).
23. Bienz, M. & Clevers, H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103, 311-320 (2000).
24. White, P., Aberle, H., & Vincent, J. P. Signaling and adhesion activities of mammalian beta-catenin and plakoglobin in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* 140, 183-195 (1998).
25. Cox, R. T., Pai, L. M., Kirkpatrick, C., Stein, J., & Peifer, M. Roles of the C terminus of Armadillo in wingless signaling in *Drosophila*. *Genetics* 153, 319-332 (1999).

26. Piedra, J. *et al.* Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20436-20443 (2001).
27. Brembeck, F. H. *et al.* Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & Development* 18, 2225-2230 (2004).
28. Gottardi, C. J. & Gumbiner, B. M. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *Journal of Cell Biology* 167, 339-349 (2004).
29. Palka, H. L. & Green, K. J. Roles of plakoglobin end domains in desmosome assembly. *Journal of Cell Science* 110, 2359-2371 (1997).
30. Jamora, C. & Fuchs, E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology* 4, E101-E108 (2002).
31. Cowin, P., Kapprell, H. P., Franke, W. W., Tamkun, J., & Hynes, R. O. Plakoglobin - A Protein Common to Different Kinds of Intercellular Adhering Junctions. *Cell* 46, 1063-1073 (1986).
32. Chang, L. & Goldman, R. D. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 601-613 (2004).
33. Revenu, C., Athman, R., Robine, S., & Louvard, D. The co-workers of actin filaments: From cell structures to signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 635-646 (2004).
34. Kartenbeck, J., Franke, W. W., Moser, J. G., & Stoffels, U. Specific Attachment of Desmin Filaments to Desmosomal Plaques in Cardiac Myocytes. *Embo Journal* 2, 735-742 (1983).
35. Kartenbeck, J., Schwechheimer, K., Moll, R., & Franke, W. W. Attachment of Vimentin Filaments to Desmosomal Plaques in Human Meningioma Cells and Arachnoidal Tissue. *Journal of Cell Biology* 98, 1072-1081 (1984).
36. Franke, W. W. & Moll, R. Cytoskeletal Components of Lymphoid Organs .1. Synthesis of Cytokeratin-8 and Cytokeratin-18 and Desmin in Subpopulations of Extrafollicular Reticulum Cells of Human Lymph-Nodes, Tonsils, and Spleen. *Differentiation* 36, 145-163 (1987).
37. Kuruc, N. & Franke, W. W. Transient Coexpression of Desmin and Cytokeratin-8 and Cytokeratin-18 in Developing Myocardial-Cells of Some Vertebrate Species. *Differentiation* 38, 177-193 (1988).
38. van der Loop, F. T. L., Schaart, G., Langmann, H., Ramaekers, F. C. S., & Viebahn, C. Rearrangement of Intercellular-Junctions and Cytoskeletal Proteins During Rabbit Myocardium Development. *European Journal of Cell Biology* 68, 62-69 (1995).

39. Allen, E., Yu, Q. C., & Fuchs, E. Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. *Journal of Cell Biology* 133, 1367-1382 (1996).
40. Bierkamp, C., McLaughlin, K. J., Schwarz, H., Huber, O., & Kemler, R. Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin. *Developmental Biology* 180, 780-785 (1996).
41. Ruiz, P. *et al.* Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *Journal of Cell Biology* 135, 215-225 (1996).
42. McGrath, J. A. *et al.* Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia skin fragility syndrome. *Nature Genetics* 17, 240-244 (1997).
43. Rickman, L. *et al.* N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Human Molecular Genetics* 8, 971-976 (1999).
44. Mckoy, G. *et al.* Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 355, 2119-2124 (2000).
45. Norgett, E. E. *et al.* Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Human Molecular Genetics* 9, 2761-2766 (2000).
46. Chidgey, M. *et al.* Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *Journal of Cell Biology* 155, 821-832 (2001).
47. Gallicano, G. I., Bauer, C., & Fuchs, E. Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature. *Development* 128, 929-941 (2001).
48. Vasioukhin, V., Bowers, E., Bauer, C., Degenstein, L., & Fuchs, E. Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nature Cell Biology* 3, 1076-1085 (2001).
49. Alcalai, R., Metzger, S., Rosenheck, S., Meiner, V., & Chajek-Shaul, T. A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 319-327 (2003).
50. Kljuic, A. *et al.* Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: Evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 113, 249-260 (2003).
51. McGrath, J. A. Hereditary diseases of desmosomes. *Journal of Dermatological Science* 20, 85-91 (1999).

52. Chidgey, M. Desmosomes and disease: an update. *Histology and Histopathology* 17, 1179-1192 (2002).
53. Garrod, D. R., Merritt, A. J., & Nie, Z. X. Desmosomal cadherins. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 537-545 (2002).
54. Franke, W. W. *et al.* Desmoplakins of Epithelial and Myocardial Desmosomes Are Immunologically and Biochemically Related. *Differentiation* 23, 115-127 (1982).
55. Schmelz, M. & Franke, W. W. Complexus Adhaerentes, A New Group of Desmoplakin-Containing Junctions in Endothelial-Cells - the Syndesmos Connecting Retothelial Cells of Lymph-Nodes. *European Journal of Cell Biology* 61, 274-289 (1993).
56. Schmelz, M., Moll, R., Kuhn, C., & Franke, W. W. Complexus Adhaerentes, A New Group of Desmoplakin-Containing Junctions in Endothelial-Cells .2. Different Types of Lymphatic Vessels. *Differentiation* 57, 97-117 (1994).
57. Valiron, O. *et al.* Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions. *Journal of Cell Science* 109, 2141-2149 (1996).
58. Kowalczyk, A. P. *et al.* VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 111, 3045-3057 (1998).
59. Zhou, X. *et al.* Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture. *Journal of Cell Science* 117, 3129-3140 (2004).
60. Getsios, S., Huen, A. C., & Green, K. J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 271-281 (2004).
61. Koch, P. J. *et al.* Identification of Desmoglein, A Constitutive Desmosomal Glycoprotein, As A Member of the Cadherin Family of Cell-Adhesion Molecules. *European Journal of Cell Biology* 53, 1-12 (1990).
62. Amagai, M., Klauskovtun, V., & Stanley, J. R. Autoantibodies Against A Novel Epithelial Cadherin in Pemphigus-Vulgaris, A Disease of Cell-Adhesion. *Cell* 67, 869-877 (1991).
63. Schafer, S., Koch, P. J., & Franke, W. W. Identification of the Ubiquitous Human Desmoglein, Dsg2, and the Expression Catalog of the Desmoglein Subfamily of Desmosomal Cadherins. *Experimental Cell Research* 211, 391-399 (1994).
64. Collins, J. E. *et al.* Cloning and Sequence-Analysis of Desmosomal Glycoprotein-2 and Glycoprotein-3 (Desmocollins) - Cadherin-Like Desmosomal

Adhesion Molecules with Heterogeneous Cytoplasmic Domains. *Journal of Cell Biology* 113, 381-391 (1991).

65. Mechanic, S., Raynor, K., Hill, J. E., & Cowin, P. Desmocollins Form A Distinct Subset of the Cadherin Family of Cell-Adhesion Molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4476-4480 (1991).

66. Kawamura, K. *et al.* Cdna Cloning and Expression of A Novel Human Desmocollin. *Journal of Biological Chemistry* 269, 26295-26302 (1994).

67. Franke, W. W., Mueller, H., Mittnacht, S., Kapprell, H. P., & Jorcano, J. L. Significance of 2 Desmosome Plaque-Associated Polypeptides of Molecular-Weights 75000 and 83000. *Embo Journal* 2, 2211-2215 (1983).

68. Kapprell, H. P., Owaribe, K., & Franke, W. W. Identification of A Basic-Protein of Mr 75,000 As An Accessory Desmosomal Plaque Protein in Stratified and Complex Epithelia. *Journal of Cell Biology* 106, 1679-1691 (1988).

69. Schmidt, A. *et al.* Plakophilin 3 - a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation* 64, 291-306 (1999).

70. Leung, C. L., Green, K. J., & Liem, R. K. H. Plakins: a family of versatile cytolinker proteins. *Trends in Cell Biology* 12, 37-45 (2002).

71. Green, K. J. & Gaudry, C. A. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 208-216 (2000).

72. Cowin, P., Franke, W. W., Grund, & Kapprell, H. P. The Desmosome-Intermediate Filament complex. In G.M. Edelman & J.P. Thiery (Eds.), *The cell in contact: Adhesion and Junctions as morphogenetic determinants*. New York: Wiley and Sons 427-460 (1985).

73. Watt, F. M., Matthey, D. L., & Garrod, D. R. Calcium-Induced Reorganization of Desmosomal Components in Cultured Human Keratinocytes. *Journal of Cell Biology* 99, 2211-2215 (1984).

74. Jones, J. C. R. & Goldman, R. D. Intermediate Filaments and the Initiation of Desmosome Assembly. *Journal of Cell Biology* 101, 506-517 (1985).

75. Holton, J. L. *et al.* Desmosomal Glycoprotein-2 and Glycoprotein-3 (Desmocollins) Show N-Terminal Similarity to Calcium-Dependent Cell Cell-Adhesion Molecules. *Journal of Cell Science* 97, 239-246 (1990).

76. Koch, P. J., Goldschmidt, M. D., Walsh, M. J., Zimbelmann, R., & Franke, W. W. Complete Amino-Acid-Sequence of the Epidermal Desmoglein Precursor Polypeptide and Identification of A 2Nd Type of Desmoglein Gene. *European Journal of Cell Biology* 55, 200-208 (1991).

77. Nilles, L. A. *et al.* Structural-Analysis and Expression of Human Desmoglein - A Cadherin-Like Component of the Desmosome. *Journal of Cell Science* 99, 809-821 (1991).
78. Parker, A. E. *et al.* Desmosomal Glycoprotein-Ii and Glycoprotein-Iii - Cadherin-Like Junctional Molecules Generated by Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10438-10445 (1991).
79. Wheeler, G. N. *et al.* Desmosomal Glycoprotein Dgi, A Component of Intercellular Desmosome Junctions, Is Related to the Cadherin Family of Cell-Adhesion Molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 4796-4800 (1991).
80. Buxton, R. S. *et al.* Nomenclature of the Desmosomal Cadherins. *Journal of Cell Biology* 121, 481-483 (1993).
81. Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science* 114, 629-641 (2001).
82. Whittock, N. V. & Bower, C. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. *Journal of Investigative Dermatology* 120, 523-530 (2003).
83. Korman, N. J., Eyre, R. W., Klauskovtun, V., & Stanley, J. R. Demonstration of An Adhering-Junction Molecule (Plakoglobin) in the Auto-Antigens of Pemphigus Foliaceus and Pemphigus Vulgaris. *New England Journal of Medicine* 321, 631-635 (1989).
84. Mathur, M., Goodwin, L., & Cowin, P. Interactions of the Cytoplasmic Domain of the Desmosomal Cadherin Dsg1 with Plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 269, 14075-14080 (1994).
85. Koch, P. J., Goldschmidt, M. D., Zimbelmann, R., Troyanovsky, R., & Franke, W. W. Complexity and Expression Patterns of the Desmosomal Cadherins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 353-357 (1992).
86. Nuber, U. A., Schafer, S., Schmidt, A., Koch, P. J., & Franke, W. W. The Widespread Human Desmocollin Dsc2 and Tissue-Specific Patterns of Synthesis of Various Desmocollin Subtypes. *European Journal of Cell Biology* 66, 69-74 (1995).
87. Green, K. J., Goldman, R. D., & Chisholm, R. L. Isolation of Cdnas Encoding Desmosomal Plaque Proteins - Evidence That Bovine Desmoplakin-I and Desmoplakin-Ii Are Derived from 2 Messenger-Rnas and A Single Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2613-2617 (1988).
88. Virata, M. L. A., Wagner, R. M., Parry, D. A. D., & Green, K. J. Molecular-Structure of the Human Desmoplakin-I and Desmoplakin-Ii Amino

Terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 544-548 (1992).

89. Cowin, P., Kapprell, H. P., & Franke, W. W. The Complement of Desmosomal Plaque Proteins in Different Cell-Types. *Journal of Cell Biology* 101, 1442-1454 (1985).

90. Angst, B. D., Nilles, L. A., & Green, K. J. Desmoplakin-Ii Expression Is Not Restricted to Stratified Epithelia. *Journal of Cell Science* 97, 247-257 (1990).

91. O'Keefe, E. J., Erickson, H. P., & Bennett, V. Desmoplakin-I and Desmoplakin-Ii - Purification and Characterization. *Journal of Biological Chemistry* 264, 8310-8318 (1989).

92. Stappenbeck, T. S. & Green, K. J. The Desmoplakin Carboxyl Terminus Coaligins with and Specifically Disrupts Intermediate Filament Networks When Expressed in Cultured-Cells. *Journal of Cell Biology* 116, 1197-1209 (1992).

93. Stappenbeck, T. S. *et al.* Functional-Analysis of Desmoplakin Domains - Specification of the Interaction with Keratin Versus Vimentin Intermediate Filament Networks. *Journal of Cell Biology* 123, 691-705 (1993).

94. Kouklis, P. D., Hutton, E., & Fuchs, E. Making A Connection - Direct Binding Between Keratin Intermediate Filaments and Desmosomal Proteins. *Journal of Cell Biology* 127, 1049-1060 (1994).

95. Kowalczyk, A. P. *et al.* The amino-terminal domain of desmoplakin binds to plakoglobin and clusters desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *Journal of Cell Biology* 139, 773-784 (1997).

96. Kowalczyk, A. P. *et al.* The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes - Implications for cutaneous disease. *Journal of Biological Chemistry* 274, 18145-18148 (1999).

97. Chitaev, N. A. *et al.* The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: Patterns of binding sites and Topogenic potential. *Journal of Cell Biology* 133, 359-369 (1996).

98. Wahl, J. K. *et al.* Plakoglobin domains that define its association with the desmosomal cadherins and the classical cadherins: Identification of unique and shared domains. *Journal of Cell Science* 109, 1143-1154 (1996).

99. Witcher, L. L. *et al.* Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10904-10909 (1996).

100. Choi, H. J. & Weis, W. I. Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *Journal of Molecular Biology* 346, 367-376 (2005).

101. Chen, X. Y., Bonne, S., Hatzfeld, M., van Roy, F., & Green, K. J. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2 - Evidence for its

diverse roles in desmosomes and beta-catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry* 277, 10512-10522 (2002).

102. Huber, A. H., Nelson, W. J., & Weis, W. I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90, 871-882 (1997).

103. Bornslaeger, E. A. *et al.* Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cell-cell borders. *Journal of Cell Science* 114, 727-738 (2001).

104. South, A. P. *et al.* Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. *Journal of Cell Science* 116, 3303-3314 (2003).

105. Smith, E. A. & Fuchs, E. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *Journal of Cell Biology* 141, 1229-1241 (1998).

106. Hatzfeld, M., Haffner, C., Schulze, K., & Vinzens, U. The function of plakophilin 1 in desmosome assembly and actin filament organization. *Journal of Cell Biology* 149, 209-222 (2000).

107. Hofmann, I. *et al.* Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *Journal of Cell Science* 113, 2471-2483 (2000).

108. Hatzfeld, M., Kristjansson, G. I., Plessmann, U., & Weber, K. Band-6 Protein, A Major Constituent of Desmosomes from Stratified Epithelia, Is A Novel Member of the Armadillo Multigene Family. *Journal of Cell Science* 107, 2259-2270 (1994).

109. Bonne, S., van Hengel, J., Nollet, F., Kools, P., & van Roy, F. Plakophilin-3, a novel Armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *Journal of Cell Science* 112, 2265-2276 (1999).

110. Bonne, S. *et al.* Defining desmosomal plakophilin-3 interactions. *Journal of Cell Biology* 161, 403-416 (2003).

111. Hatzfeld, M. & Nachtsheim, C. Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: Evidence for a subfamily of closely related proteins. *Journal of Cell Science* 109, 2767-2778 (1996).

112. Hatzfeld, M., Green, K. J., & Sauter, H. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *Journal of Cell Science* 116, 1219-1233 (2003).

113. Reynolds, A. B. *et al.* Identification of A New Catenin - the Tyrosine Kinase Substrate P120(Cas) Associates with E-Cadherin Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 14, 8333-8342 (1994).

114. Shibamoto, S. *et al.* Association of P120, A Tyrosine Kinase Substrate, with E-Cadherin/Catenin Complexes. *Journal of Cell Biology* 128, 949-957 (1995).
115. Staddon, J. M., Smales, C., Schulze, C., Esch, F. S., & Rubin, L. L. P120, A P120-Related Protein (P100), and the Cadherin Catenin Complex. *Journal of Cell Biology* 130, 369-381 (1995).
116. Paffenholz, R. & Franke, W. W. Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation* 61, 293-304 (1997).
117. Paffenholz, R., Kuhn, C., Grund, C., Stehr, S., & Franke, W. W. The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Experimental Cell Research* 250, 452-464 (1999).
118. Anastasiadis, P. Z. & Reynolds, A. B. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science* 113, 1319-1334 (2000).
119. Mertens, C. Plakophilin 2: ein neues Cytoskelettprotein mit molekularen Interaktionen im Zellkern und in Zellverbindungen. Doktorarbeit. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland. 161 Seiten. 1999.
120. Mertens, C., Kuhn, C., Moll, R., Schwetlick, I., & Franke, W. W. Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. *Differentiation* 64, 277-290 (1999).
121. Mertens, C. *et al.* Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 7795-7800 (2001).
122. Müller, J., Ritt, D. A., Copeland, T. D., & Morrison, D. K. Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *Embo Journal* 22, 4431-4442 (2003).
123. Boller, K., Vestweber, D., & Kemler, R. Cell-Adhesion Molecule Uvomorulin Is Localized in the Intermediate Junctions of Adult Intestinal Epithelial-Cells. *Journal of Cell Biology* 100, 327-332 (1985).
124. Nagafuchi, A. & Takeichi, M. Transmembrane Control of Cadherin-Mediated Cell-Adhesion - A 94 Kda Protein Functionally Associated with A Specific Region of the Cytoplasmic Domain of E-Cadherin. *Cell Regulation* 1, 37-44 (1989).
125. Ozawa, M., Baribault, H., & Kemler, R. The Cytoplasmic Domain of the Cell-Adhesion Molecule Uvomorulin Associates with 3 Independent

Proteins Structurally Related in Different Species. *Embo Journal* 8, 1711-1717 (1989).

126. Hulsken, J., Birchmeier, W., & Behrens, J. E-Cadherin and Apc Compete for the Interaction with Beta-Catenin and the Cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 127, 2061-2069 (1994).

127. Ranscht, B. Cadherins and Catenins - Interactions and Functions in Embryonic-Development. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 740-746 (1994).

128. Aberle, H., Schwartz, H., & Kemler, R. Cadherin-catenin complex: Protein interactions and their implications for cadherin function. *Journal of Cellular Biochemistry* 61, 514-523 (1996).

129. Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., & Ben Ze'ev, A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *Journal of Clinical Investigation* 109, 987-991 (2002).

130. Geiger, B., Volk, T., & Volberg, T. Molecular Heterogeneity of Adherens Junctions. *Journal of Cell Biology* 101, 1523-1531 (1985).

131. Jackson, B. W. *et al.* Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis - Intermediate Filaments of the Cytokeratin Type and Desmosomes in Pre-Implantation Embryos. *Differentiation* 17, 161-179 (1980).

132. Jackson, B. W., Grund, C., Winter, S., Franke, W. W., & Illmensee, K. Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis .2. Epithelial Differentiation and Intermediate-Sized Filaments in Early Postimplantation Embryos. *Differentiation* 20, 203-216 (1981).

133. Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B. W., & Illmensee, K. Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis .3. Primary Mesenchymal Cells and the 1st Appearance of Vimentin Filaments. *Differentiation* 23, 43-59 (1982).

134. Franke, W. W., Grund, C., Jackson, B. W., & Illmensee, K. Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis .4. Ultrastructure of Primary Mesenchymal Cells and Their Cell-Cell Interactions. *Differentiation* 25, 121-141 (1983).

135. Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., & Fuchs, E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100, 209-219 (2000).

136. Gumbiner, B., Stevenson, B., & Grimaldi, A. The Role of the Cell-Adhesion Molecule Uvomorulin in the Formation and Maintenance of the Epithelial Junctional Complex. *Journal of Cell Biology* 107, 1575-1587 (1988).

137. Lewis, J. E. *et al.* Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *Journal of Cell Biology* 136, 919-934 (1997).

138. Koeser, J., Troyanovsky, S. M., Grund, C., & Franke, W. W. De novo formation of desmosomes in cultured cells upon transfection of genes encoding specific desmosomal components. *Experimental Cell Research* 285, 114-130 (2003).
139. Borrmann, C. Molekulare Charakterisierung der Adhärenz-Zellverbindungen des Herzens: Identifizierung einer neuen Art, der *Area composita*. Doktorarbeit. Universität von Heidelberg, Heidelberg, Deutschland. 119 Seiten. 2000.
140. Hatsell, S. & Cowin, P. Deconstructing desmoplakin. *Nature Cell Biology* 3, E270-E272 (2001).
141. Gallicano, G. I. *et al.* Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *Journal of Cell Biology* 143, 2009-2022 (1998).
142. Eshkind, L. *et al.* Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *European Journal of Cell Biology* 81, 592-598 (2002).
143. Stanley, J. R., Koulu, L., Klauskovtun, V., & Steinberg, M. S. A Monoclonal-Antibody to the Desmosomal Glycoprotein Desmoglein-1 Binds the Same Polypeptide As Human Autoantibodies in Pemphigus Foliaceus. *Journal of Immunology* 136, 1227-1230 (1986).
144. Amagai, M., Koch, P. J., Nishikawa, T., & Stanley, J. R. Pemphigus vulgaris antigen (Desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *Journal of Investigative Dermatology* 106, 351-355 (1996).
145. Koch, P. J. *et al.* Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (Desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *Journal of Cell Biology* 137, 1091-1102 (1997).
146. Montagutelli, X., Lalouette, A., Boulouis, H. J., Guenet, J. L., & Sundberg, J. P. Vesicle formation and follicular root sheath separation in mice homozygous for deleterious alleles at the balding (bal) locus. *Journal of Investigative Dermatology* 109, 324-328 (1997).
147. Whittock, N. V. *et al.* Genomic amplification of the human plakophilin 1 gene and detection of a new mutation in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Journal of Investigative Dermatology* 115, 368-374 (2000).
148. Hamada, T. *et al.* Genotype-phenotype correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1. *Experimental Dermatology* 11, 107-114 (2002).
149. Sprecher, E. *et al.* Homozygous splice site mutations in PKP1 result in loss of epidermal plakophilin 1 expression and underlie ectodermal

dysplasia/skin fragility syndrome in two consanguineous families. *Journal of Investigative Dermatology* 122, 647-651 (2004).

150. Rampazzo, A. *et al.* Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *American Journal of Human Genetics* 71, 1200-1206 (2002).

151. Keith, D. *et al.* Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Human Molecular Genetics* 8, 143-148 (1999).

152. Whittock, N. V. *et al.* Striate palmoplantar keratoderma resulting from desmoplakin haploinsufficiency. *Journal of Investigative Dermatology* 113, 940-946 (1999).

153. Arnemann, J., Sullivan, K. H., Magee, A. I., King, I. A., & Buxton, R. S. Stratification-Related Expression of Isoforms of the Desmosomal Cadherins in Human Epidermis. *Journal of Cell Science* 104, 741-750 (1993).

154. Legan, P. K. *et al.* The Bovine Desmocollin Family - A New Gene and Expression Patterns Reflecting Epithelial-Cell Proliferation and Differentiation. *Journal of Cell Biology* 126, 507-518 (1994).

155. Hunt, D. M. *et al.* Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. *European Journal of Human Genetics* 9, 197-203 (2001).

156. Protonotarios, N. *et al.* Cardiac Abnormalities in Familial Palmoplantar Keratosis. *British Heart Journal* 56, 321-326 (1986).

157. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem-Cells. *Cell* 51, 503-512 (1987).

158. Sedmera, D., Pexieder, T., Vuillemin, M., Thompson, R. P., & Anderson, R. H. Developmental patterning of the myocardium. *Anatomical Record* 258, 319-337 (2000).

159. Gerull, B. *et al.* Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nature Genetics* 36, 1162-1164 (2004).

160. Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Stappenbeck, T. S., & Green, K. J. Breaking the connection: Displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *Journal of Cell Biology* 134, 985-1001 (1996).

161. Pasdar, M. & Nelson, W. J. Kinetics of Desmosome Assembly in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial-Cells - Temporal and Spatial Regulation of Desmoplakin Organization and Stabilization Upon Cell Cell Contact .1. Biochemical-Analysis. *Journal of Cell Biology* 106, 677-685 (1988).

162. Pasdar, M., Li, Z., & Chan, H. Desmosome Assembly and Disassembly Are Regulated by Reversible Protein-Phosphorylation in Cultured Epithelial-Cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 30, 108-121 (1995).
163. Boneko, V. M. & Merker, H. J. Development and Morphology of the Periderm of Mouse Embryos (Days 9-12 of Gestation). *Acta Anatomica* 133, 325-336 (1988).
164. McKenna, W. J. *et al.* Diagnosis of Arrhythmogenic Right-Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *British Heart Journal* 71, 215-218 (1994).
165. Gemayel, C., Pelliccia, A., & Thompson, P. D. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 38, 1773-1781 (2001).
166. Ahmad, F. The molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia-cardiomyopathy. *Clinical and Investigative Medicine-Medecine Clinique et Experimentale* 26, 167-178 (2003).
167. Liew, C. C. & Dzau, V. J. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nature Reviews Genetics* 5, 811-825 (2004).
168. Rampazzo, A. *et al.* The Gene for Arrhythmogenic Right-Ventricular Cardiomyopathy Maps to Chromosome 14Q23-Q24. *Human Molecular Genetics* 3, 959-962 (1994).
169. Rampazzo, A. *et al.* A New Locus for Arrhythmogenic Right-Ventricular Cardiomyopathy (Arvd2) Maps to Chromosome 1Q42-Q43. *Human Molecular Genetics* 4, 2151-2154 (1995).
170. Severini, G. M. *et al.* A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14. *Genomics* 31, 193-200 (1996).
171. Rampazzo, A. *et al.* ARVD4, a new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, maps to chromosome 2 long arm. *Genomics* 45, 259-263 (1997).
172. Ahmad, F. *et al.* Localization of a gene responsible for arrhythmogenic right ventricular dysplasia to chromosome 3p23. *Circulation* 98, 2791-2795 (1998).
173. Coonar, A. S. *et al.* Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation* 97, 2049-2058 (1998).
174. Melberg, A. *et al.* Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy linked to chromosome 10q. *Annals of Neurology* 46, 684-692 (1999).

175. Li, D. X. *et al.* The locus of a novel gene responsible for arrhythmogenic right-ventricular dysplasia characterized by early onset and high penetrance maps to chromosome 10p12-p14. *American Journal of Human Genetics* 66, 148-156 (2000).
176. Tiso, N. *et al.* Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Human Molecular Genetics* 10, 189-194 (2001).
177. Basso, C. *et al.* Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy causing sudden cardiac death in boxer dogs - A new animal model of human disease. *Circulation* 109, 1180-1185 (2004).
178. Kirchhof, P. *et al.* Ventricular arrhythmias, increased cardiac calmodulin kinase II expression, and altered repolarization kinetics in ANP receptor deficient mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 36, 691-700 (2004).
179. Ozcelik, C. *et al.* Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8880-8885 (2002).
180. Zagorski, J., Debelak, J., Gellar, M., Watts, J. A., & Kline, J. A. Chemokines accumulate in the lungs of rats with severe pulmonary embolism induced by polystyrene microspheres. *Journal of Immunology* 171, 5529-5536 (2003).
181. Geisterfer-Lowrance, A. A. T. *et al.* A Molecular-Basis for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy - A Beta-Cardiac Myosin Heavy-Chain Gene Missense Mutation. *Cell* 62, 999-1006 (1990).
182. Geisterfer-Lowrance, A. A. T. *et al.* A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 272, 731-734 (1996).
183. Sambrock, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (1989).
184. Ausubel, F. M. *et al.* *Current protocols in molecular biology* (1987).
185. Riethmacher, D., Brinkmann, V., & Birchmeier, C. A Targeted Mutation in the Mouse E-Cadherin Gene Results in Defective Preimplantation Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 855-859 (1995).
186. Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., & Monk, M. Hprt-Deficient (Lesch-Nyhan) Mouse Embryos Derived from Germline Colonization by Cultured-Cells. *Nature* 326, 292-295 (1987).

187. Kuhn, R., Rajewsky, K., & Muller, W. Generation and Analysis of Interleukin-4 Deficient Mice. *Science* 254, 707-710 (1991).
188. Ramirez-Solis, R. *et al.* Genomic Dna Microextraction - A Method to Screen Numerous Samples. *Analytical Biochemistry* 201, 331-335 (1992).
189. Huelsken, J. *et al.* Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mi. *Journal of Cell Biology* 148, 567-578 (2000).
190. Borrmann, C. M. *et al.* Molecular diversity of plaques of epithelial-adhering junctions. *Epithelial Transport and Barrier Function* 915, 144-150 (2000).
191. Schmelz, M., Duden, R., Cowin, P., & Franke, W. W. A Constitutive Transmembrane Glycoprotein of Mr-165000 (Desmoglein) in Epidermal and Non-Epidermal Desmosomes .1. Biochemical-Identification of the Polypeptide. *European Journal of Cell Biology* 42, 177-183 (1986).
192. Nuber, U. A., Schafer, S., Stehr, S., Rackwitz, H. R., & Franke, W. W. Patterns of desmocollin synthesis in human epithelia: Immunolocalization of desmocollins 1 and 3 in special epithelia and in cultured cells. *European Journal of Cell Biology* 71, 1-13 (1996).
193. Schäfer, S., Stumpp, S., & Franke, W. W. Immunological identification and characterization of the desmosomal cadherin Dsg2 in coupled and uncoupled epithelial cells and in human tissues. *Differentiation* 60, 99-108 (1996).
194. Kurzen, H. *et al.* Compositionally different desmosomes in the various compartments of the human hair follicle. *Differentiation* 63, 295-304 (1998).
195. Langbein, L. *et al.* Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *European Journal of Cell Biology* 81, 419-435 (2002).
196. Franke, W. W., Grund, C., Osborn, M., & Weber, K. The intermediate-sized filaments in rat kangaroo PtK2 cells. I. Morphology in situ. *Cytobiologie* 17, 365-391 (1978).
197. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin den 09.06.2005

Katja Susann Grossmann

Publikationsliste

Große Teile dieser Arbeit sind in folgenden Zeitschriften publiziert:

Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke WW, Birchmeier W. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):149-60.

Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, **Grossmann KS**, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2004 Nov;36(11):1162-4.

Weitere Publikationen:

van den Akker E, van Dijk T, Parren-van Amelsvoort M, **Grossmann KS**, Schaeper U, Toney-Earley K, Waltz SE, Lowenberg B, von Lindern M. Tyrosine kinase receptor RON functions downstream of the erythropoietin receptor to induce expansion of erythroid progenitors. *Blood.* 2004 Jun 15;103(12):4457-65.